

***Synthese und Charakterisierung einer Peptidbibliothek
elektrophiler Verbindungen als Inhibitoren von
papainähnlichen Cysteinproteasen***

und

***Synthese einer α -D-Hydroxysäuren-Bibliothek für die
chemoenzymatische Synthese neuer Cyclodepsipeptide***

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

Sven Christian Feifel

aus Mutlangen

Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schomäcker
1. Bericht/Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Roderich Süßmuth
2. Bericht/Gutachter:	PD Dr. rer. nat. Hans von Döhren

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29. Oktober 2009

Berlin 2009

D 83

Zusammenfassung

Synthese und Charakterisierung einer Peptidbibliothek elektrophiler Verbindungen als Inhibitoren von papainähnlichen Cysteinproteasen und Synthese einer α -D-Hydroxysäuren-Bibliothek für die chemoenzymatische Synthese neuer Cyclodepsipeptide

vorgelegt von Sven Christian Feifel

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei unterschiedlichen Problemstellungen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Darstellung einer α -D-Hydroxysäuren-Bibliothek und deren Einsatz für die *in vitro*-Synthese neuer Cyclodepsipeptid-Derivate beschrieben. Wichtige Repräsentanten sind die Hexa-, und Octa-Depsipeptide Enniatin und PF 1022. Zahlreiche Derivate von Enniatin wurden aus einer Vielzahl an Pilzen isoliert, z.B. *Fusarium*, *Beauveria*, *Alternaria*, *Verticillium* und *Paecilomyces*. Bei diesen attraktiven Wirksubstanzen, handelt es sich um Produkte des Sekundärmetabolismus. Die Bioaktivitäten reichen von antitumor, anthelmintisch, fungizid, immunsupprimierend, antimalaria bis hin zu entzündungshemmend. Daher sind sie von großem Interesse für die Entwicklung pharmazeutischer Substanzen. Zwar wurden bislang zahlreiche totalsynthetische und biosynthetische Arbeiten auf dem Gebiet dieser Substanzklassen veröffentlicht, eine umfangreiche Untersuchung der Hydroxysäurenbindungstelle sowie ein schneller chemoenzymatischer Zugang zu einer Vielfalt von Cyclodepsipeptid-Verbindungen existiert jedoch nicht. Ziel der Arbeit war der schnelle Zugang zu einer Vielzahl unterschiedlicher enantiomerenreiner α -D-Hydroxysäuren für deren Verwendung in der *in vitro*-Synthese neuer Hexa- und Octa-Cyclodepsipeptide. Die Herausforderung lag primär in der Erarbeitung eines einheitlichen Syntheseprotokolls, mit dem es möglich war ein breites Spektrum proteinogener und nicht-proteinogener α -D-Hydroxysäuren zu synthetisieren. Die ausgearbeitete Synthesestrategie gestattet den schnellen und enantioselektiven Zugang zu einer Vielzahl unterschiedlicher α -D-Hydroxysäuren-Derivate, welche anschließend erfolgreich bei der *in vitro*-synthetischen Darstellung neuer Enniatin- und PF-Derivate eingesetzt wurden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die erste Synthese und enzymatische Charakterisierung von trisubstituierten elektrophilen „*Warheads*“ (Epoxid, Diol, Alken) in Verbindung mit einem *E64c-like*- oder *CA028-like*-Dipeptid beschrieben. Zusätzlich konnten Resultate aus SAR-Studien zu den peptischen Verbindungen als auch der synthetischen Intermediate (Epoxide, Alkene, Diole) erste Resultate zur biologischen Aktivität der Verbindungen liefern. Die Referenzsubstanz E-64 (**21**) wurde 1978 von Hanada *et al.* aus *Aspergillus japonicus* TPR-64 isoliert. Kurz darauf wurde für E-64 und seine synthetischen Derivate eine selektive Aktivität gegenüber den papainähnlichen Cysteinproteasen nachgewiesen. Mittels NMR und Röntgenkristallographie wurde ein hochkonservierter Bindungsmodus von E-64 ermittelt. Ausgehend von kommerziell erhältlichen α -L-Aminosäuren konnten mittels iterativer Funktionalisierung über nur 5 Stufen die trisubstituierten „*Wahrheads*“ dargestellt, und anschließend in Lösung mit den *E64c*- und *CA028-like*-Dipeptid-Motiven verknüpft werden. Die etablierte Syntheseroute erlaubt auch zukünftig den schnellen Zugang zu neuen Derivaten. Die enzymatische Charakterisierung der Verbindungen ergab beachtliche Aktivitäten der Diol- und Epoxy-Tripeptide bezüglich CatB und CatL. Eine Auswahl synthetischer Intermediate wurde zusammen mit einer Auswahl von Tripeptiden in SAR-Studien hinsichtlich einer antibakteriellen Wirkung untersucht. Für einige der Verbindungen wurde eine bemerkenswerte antibakterielle Aktivität gegenüber Gram-positive Erregern, und speziell *S. aureus* beobachtet.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Feifel, S. C., Schmiederer, T., Hornbogen T., Berg H., Zocher R., Süssmuth, R. D., *In Vitro Synthesis of New Enniatins: Probing the α -D-Hydroxy Carboxylic Binding Pocket of the Multienzyme Enniatin Synthetase*, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1767 – 1770.

Müller, J., Feifel, S. C., Schmiederer, T., Zocher[†], R., Süssmuth, R. D., *In vitro Synthesis of New Cyclodepsipeptides of the PF1022-Type: Probing the α -D-Hydroxy Acid Tolerance of PF1022 Synthetase*, *ChemBioChem* **2009**, 10, 323 – 328.

Feifel, S. C., Dettner, F., Süssmuth, R. D., *Synthesis of New Trisubstituted Epoxysuccinic Acid Derivatives for Selective Inhibition of Papain-like Cysteine Proteases*, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, kurz vor der Einreichung.

Feifel, S. C., Süssmuth, R. D., *Synthesis of New E64c- and CA028-like Cysteine Proteases Inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, in Vorbereitung.

Feifel, S.C., Süssmuth, R. D., *Enzymatic Screening and Antimicrobial Activity of New E64c- & CA028-like Inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, in Vorbereitung.

Tagungsbeiträge:

Poster: Feifel, S. C., Schmiederer T., Süssmuth, R. D., *Enzymatic synthesis of a new Enniatin by use of the Multienzyme Enniatin Synthetase (ESyn)*, 8. Deutsches Peptidsymposium, Heidelberg, 14.03. - 17.03. 2007.

Poster: Müller, J., Feifel, S. C., Süssmuth, R. D., *In Vitro Synthesis of new Enniatin and PF1022 Derivates*, VAAM-International Workshop, Berlin, 29.09. - 01.10.2008.

Poster: Müller, J., Feifel, S. C., Süssmuth, R. D., *Chemoenzymatic generation of New Cyclodepsipeptides by exploiting the promiscuity of peptide synthetases*, 9. Deutsches Peptidsymposium, Göttingen, 14.03. - 17.03. 2009.

Meinem Vater

„Die Wahrheit ist objektiv und absolut. Aber wir können niemals sicher sein, dass wir sie gefunden haben. Unser Wissen ist immer Vermutungswissen. Unsere Theorien sind Hypothesen. Wir prüfen auf Wahrheit, indem wir das Falsche ausschneiden“

Karl Popper

(Objektive Knowledge, 1972)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Roderich Süßmuth

in der Zeit von Juli 2005 bis Oktober 2009 am Institut für Chemie der Fakultät II der Technischen Universität Berlin angefertigt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roderich Süßmuth für die Überlassung des Themas, hervorragende Arbeitsbedingungen und die ausgezeichnete Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herr PD Dr. Hans von Döhren danke ich herzlich für die bereitwillige Übernahme der zweiten Berichterstattung.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Schomäcker danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn PD Dr. Rainer Zocher[†] danke für die *in vitro*-Synthese der neuen Enniatin-Derivate und die Erarbeitung publizierbarer Ergebnisse, sowie für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und Hilfestellungen bei der Etablierung meiner enzymkinetischen Assays.

Frau Dipl.-Chem. Nicole Sattler danke ich für die Durchführung von antibakteriellen Testierungen und die stets gute Zusammenarbeit.

Herrn Dipl.-Chem. Jonny Nachtigall und Dipl.-Chem. Florian Oldach danke ich für die große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung von HPLC-ESI-MS Messungen.

Herrn Dipl.-Chem. Marius Löhken danke ich für die moralische Unterstützung während der enzymkinetischen Assays.

Herrn Dipl.-Chem. Jochen Weckesser danke ich für die technische Einführung am Spektralpolarimeter.

Dr. Suada Turkanović danke ich für die schöne Laborzeit und zahlreiche Sicherheitsunterweisungen.

Frau Dipl.-Chem. Jane Müller danke ich für die *in vitro* Synthese der neuen PF 1022-Derivate und die Erarbeitung publizierbarer Ergebnisse und die gute Zusammenarbeit.

Dank gilt sämtlichen Mitarbeitern und meinen Praktikanten an der TU-Berlin, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Laborkollegen und Freund Frank danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen, sowie die abwechslungsreiche Gestaltung des Laboralltags.

Für das gute Arbeitsklima und Hilfestellungen möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Süssmuth bedanken, namentlich: Louise Aigrain, Mahsuni Atli, Todor Baramov, Pierre-Henri Beyrière, Dr. Diane Butz, Dr. Brian Davis, Dr. Frank Dettner, Elvira Gottardi, Anne Hänchen, Soliman Alsayd Helali, Maik Henkel, Dr. Simone Keller, Joanna Krawczyk, Benjamin Landmann, Khai Ming Lie, Marius Löhken, Diana Matthes, Arun Kumar Mishra, Eva Mösker, Lise Molinari, Jane Müller, Wolfgang Müller, Jonny Nachtigall, Florian Oldach, Vanessa Peters, Stefan Pohle, Marta Ramirez Hernandez, Saskia Rausch, Dr. Pierre-Loic Saaidi, Georg Sambeth, Nicole Sattler, Dr. Heiko Schadt, Caroline Schloßer, Dr. Timo Schmiederer, Dr. Kathrin Schneider, Hanna von Suchodolez, Dr. Suada Turkanović, Kati Winter und Dr. Falko Wolter.

Über den Laboralltag hinaus danke ich meiner Freundin Beata und dem kleinen Meric für ihre ausdauernde Unterstützung im Verlauf meiner Promotion und die schöne Zeit. Mein besonderer Dank gilt zudem meiner Familie, namentlich: Hermann Feifel, Martina Feifel und Achim Feifel die mich moralisch und finanziell seit Beginn meines Studiums unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hermann Fasel für seine Unterstützung und Ermunterung an meinen Zielen festzuhalten und seiner wohlwollenden Förderung während meines beruflichen Werdegangs.

Ein Dank gilt auch meinem Apotheker des Vertrauens Dr. Michael Heinzelmann, der sich im Verlauf meiner Promotion fürsorglich um mein körperliches Wohlbefinden gekümmert hat.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Theoretischer Hintergrund.....	6
2.1	Cysteinproteasen.....	6
2.2	Cathepsine.....	7
2.2.1	Strukturmodelle der Cathepsine.....	8
2.2.2	Physiologie der Cathepsine.....	11
2.2.3	Pathophysiologie der Cathepsine.....	13
2.3	Inhibitoren der papainähnlichen Cysteinproteasen.....	15
2.3.1	Das katalytische Zentrum nach Schechter und Berger.....	16
2.3.2	Endogene Inhibitoren der Cysteinproteasen.....	17
2.3.3	Niedermolekulare synthetische Inhibitoren und Naturstoffe.....	19
2.4	Mechanistische Details wichtiger Schlüsselreaktionen.....	30
2.4.1	Stereoselektive Diazotierung zur Darstellung enantiomerenreiner α -L-, und α -D-Hydroxysäuren.....	31
2.4.2	Oxidation von sekundären α -Hydroxysäuren zu α -Ketosäuren.....	32
2.4.3	Die <i>trans</i> -selektive Wittig-Reaktion zum Aufbau trisubstituierter (<i>E</i>)-Alkene aus α -Oxosäureestern.....	34
2.4.4	Die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (Still-Gennari-Variante) zum Aufbau trisubstituierter (<i>Z</i>)-Alkene aus α -Oxosäureestern.....	35
2.4.5	Die asymmetrische Dihydroxylierung (AD) nach Sharpless zur Darstellung enantiomerenreiner 2,3-Diol-dicarboxylate.....	38
2.4.6	Epoxidierungs-Reaktion zum Aufbau trisubstituierter Epoxide ausgehend von (<i>E</i>)- bzw. (<i>Z</i>)-Alkenen.....	44
2.4.7	Intramolekulare S_N2 -Reaktion zum Aufbau trisubstituierter enantiomerenreiner Epoxide aus 2,3-Diol-dicarboxylaten.....	46
2.5	Peptidsynthese.....	48
2.6	Enzymkinetik.....	56
2.6.1	Charakterisierung irreversibler Hemmung.....	57
2.6.2	Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou.....	62
2.6.3	Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson.....	63
2.6.4	Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung.....	64
2.7	Cyclodepsipeptide.....	65
2.7.1	Peptidantibiotika.....	66
2.7.2	Peptidsynthetasen.....	67
2.7.3	NRPS der Cyclodepsipeptide (PF1022 und Enniatin).....	67
2.7.4	Enniatine (Cyclohexadepsipeptide).....	69
2.7.5	PF 1022 (Cyclooctadepsipeptide).....	71
2.7.6	Konzept der „Vorläufer-gerichteten Biosynthese“.....	75
3	Aufgabenstellung.....	76
4	Ergebnisse und Diskussion.....	80
4.1	Synthese einer α -D-Hydroxysäurenbibliothek für die chemoenzymatische Synthese neuer Cyclodepsipeptide.....	80
4.1.1	Darstellung der aliphatischen α -D-Hydroxysäuren.....	84
4.1.2	Darstellung der halogenierten und polaren α -D-Hydroxysäuren.....	85

4.1.3	Darstellung der α,α -quartär substituierten Hydroxysäuren.....	87
4.1.4	Darstellung der zyklischen und aromatischen α -D-Hydroxysäuren.....	88
4.1.5	Darstellung der heterozyklischen und substituierten aromatischen α -D-Hydroxysäuren.....	89
4.2	Aufbau einer gegen Cysteinproteasen gerichteten Tripeptid-Inhibitorbibliothek	90
4.2.1	Synthesestudien zum Aufbau der Tripeptid-Inhibitoren an fester Phase	96
4.2.2	Schematischer Aufbau der <i>E64c</i> - und <i>CA028-like</i> -Tripeptid-Inhibitorbibliothek	98
4.2.3	Synthese der <i>E64c</i> - und <i>CA028-like</i> -Dipeptide	100
4.2.4	Synthese der elektrophilen „Warheads“	104
4.2.5	Kupplung der <i>E64c</i> - und <i>CA028-like</i> -Dipeptide mit „Warhead“-Fragmenten zur Darstellung der Tripeptid-Bibliothek	137
4.3	Enzymkinetische Charakterisierung der <i>E64c</i>- und <i>CA028-like</i>-Inhibitorbibliothek.....	158
4.3.1	Screening der <i>E64c</i> - und <i>CA028-like</i> -Tripeptide gegen papainähnliche Cysteinproteasen	159
4.3.2	Bestimmung der IC_{50} -Werte und Hemmkonstanten von <i>E64c</i> - und <i>CA028-like</i> -Tripeptiden gegen Papain, Cathepsin B und L	191
4.3.3	Strukturwirkungsbeziehung der getesteten <i>E64c</i> - bzw. <i>CA028-like</i> -Tripeptide	209
4.4	Antibakterielle Testierung von <i>E64c</i>- und <i>CA028-like</i>-Tripeptiden und deren synthetische Intermediate.....	218
4.5	Chemoenzymatische Synthese neuer Hexa- und Octa-Cyclodepsipetide.....	231
4.5.1	<i>In vitro</i> -Synthese neuer Enniatin-Derivate	231
4.5.2	<i>In vitro</i> -Synthese neuer PF-1022 A-Derivate.....	237
5	Zusammenfassung und Ausblick	246
6	Experimenteller Teil	253
6.1	Allgemeine Informationen	253
6.2	Experimentelle Details zur Durchführung enzymkinetischer Testierungen	256
6.2.1	Kontinuierlicher Assay des Tripeptid-Screenings	258
6.2.2	Kontinuierlicher Assay für die Bestimmung der IC_{50} -Werte.....	261
6.2.3	Verdünnungsassay für die Bestimmung der Hemmkonstanten	265
6.3	Experimentelle Details zur Durchführung antibakterieller Testierungen.....	269
6.4	Experimentelle Details zur Durchführung der <i>in vitro</i>-Assays	274
6.4.1	Enniatin-Synthetase <i>in vitro</i> -Assay	274
6.4.2	PF-Synthetase <i>in vitro</i> -Assay	275
6.5	Synthesevorschriften und analytische Daten der einzelnen Verbindungen	275
6.6	NMR-Spektren von ausgewählten synthetischen Intermediaten und <i>E64c-like</i>- bzw. <i>CA028-like</i>-Tripeptiden	454
6.6.1	1H -, und ^{13}C -NMR: (<i>S</i>)-2-Hydroxy-Phe-OH (346)	454
6.6.2	1H -, und ^{13}C -NMR: 2-Oxo-Ile-OH (370)	455
6.6.3	1H -, und ^{13}C -NMR: 2-Oxo-Ile-OMe (392)	456
6.6.4	1H -, und ^{13}C -NMR: (<i>E</i>)-Alken-Ala (404)	457
6.6.5	1H -, und ^{13}C -NMR: (<i>Z</i>)-Alken-Ala (421)	458
6.6.6	1H -, und ^{13}C -NMR: (<i>S,S</i>)-Diol-Ala (454).....	459
6.6.7	1H -, und ^{13}C -NMR: (<i>R,R</i>)-Diol-Ala (458)	460
6.6.8	1H -, und ^{13}C -NMR: (<i>S,S</i>)-Epoxy-Phg (462).....	461
6.6.9	1H -, und ^{13}C -NMR: (<i>R,R</i>)-Epoxy-Phg (463)	462
6.6.10	1H -, und ^{13}C -NMR: <i>E64c-like</i> -(<i>E</i>)-Alken-Ala-OtBu (528).....	463
6.6.11	1H -, und ^{13}C -NMR: <i>E64c-like</i> -(<i>E</i>)-Alken-Ala-OH (535)	464
6.6.12	1H -, und ^{13}C -NMR: <i>CA028-like</i> -(<i>E</i>)-Alken-Ala-OMe (543)	465
6.6.13	1H -, und ^{13}C -NMR: <i>CA028-like</i> -(<i>E</i>)-Alken-Leu-OH (552).....	466
6.6.14	1H -, und ^{13}C -NMR: <i>E64c-like</i> -(<i>S,S</i>)-Diol-Phg-OtBu (560).....	467
6.6.15	1H -, und ^{13}C -NMR: <i>CA028-like</i> -(<i>S,S</i>)-Diol-Leu-OMe (574).....	468
6.6.16	1H -, und ^{13}C -NMR: <i>CA028-like</i> -(<i>S,S</i>)-Diol-Leu-OH (583)	469

6.6.17	¹ H-, und ¹³ C-NMR: <i>CA028-like-(rac)</i> -Epoxy-Cha-OMe (605)	470
6.6.18	¹ H-, und ¹³ C-NMR: <i>E64c-like-(rac)</i> -Epoxy-Cha-OtBu (595).....	471
6.7	HPLC-ESI-MS-Analytik ausgewählter <i>E64c-like</i>- und <i>CA028-like</i>- Verbindungen	
	(Tripeptidinhhibitoren).....	472
6.7.1	HPLC-ESI-MS: <i>E64c-like-(E)</i> -Alken-Phe-OtBu (531)	472
6.7.2	HPLC-ESI-MS: <i>E64c-like-(E)</i> -Alken-Phe-OH (538).....	472
6.7.3	HPLC-ESI-MS: <i>E64c-like-(S,S)</i> -Diol-Ala-OtBu (558).....	473
6.7.4	HPLC-ESI-MS: <i>E64c-like-(S,S)</i> -Diol-Ala-OH (566)	473
6.7.5	HPLC-ESI-MS: <i>E64c-like-(S,S)</i> -Epoxy-Ala-OtBu (590).....	474
6.7.6	HPLC-ESI-MS: <i>E64c-like-(S,S)</i> -Epoxy-Phg-OtBu (592).....	474
6.7.7	HPLC-ESI-MS: <i>E64c-like-(S,S)</i> -Epoxy-Phe-OtBu (593).....	475
6.7.8	HPLC-ESI-MS: <i>E64c-like-(S,S)</i> -Epoxy-Phe-OH (611)	475
6.7.9	HPLC-ESI-MS: <i>CA028-like-(E)</i> -Alken-Leu-OMe (544)	476
6.7.10	HPLC-ESI-MS: <i>CA028-like-(E)</i> -Alken-Leu-OH (552)	476
6.7.11	HPLC-ESI-MS: <i>CA028-like-(S,S)</i> -Diol-Phe-OMe (577)	477
6.7.12	HPLC-ESI-MS: <i>CA028-like-(S,S)</i> -Diol-Phe-OH (585)	477
6.7.13	HPLC-ESI-MS: <i>CA028-like-(R,R)</i> -Epoxy-Cha-OMe (605).....	478
6.7.14	HPLC-ESI-MS: <i>CA028-like-(rac)</i> -Epoxy-β-Fluor-Ala-OMe (603)	478
6.7.15	HPLC-ESI-MS: <i>CA028-like-(R,R)</i> -Epoxy-Phe-OMe (602).....	479
6.7.16	HPLC-ESI-MS: <i>CA028-like-(R,R)</i> -Epoxy-Phe-OH (612)	479
6.8	Chirale-HPLC-Analytik von enantiomeren (<i>S,S</i>)- bzw. (<i>R,R</i>)-Diolen und Epoxiden	480
6.8.1	Chiral-AD-H: (<i>R,R</i>)- und (<i>S,S</i>)-Diol-Ala [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]	480
6.8.2	Chiral-AD-H: (<i>R,R</i>)- und (<i>S,S</i>)-Diol-Phg [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50].....	481
6.8.3	Chiral-AD-H: (<i>R,R</i>)- und (<i>S,S</i>)-Diol-Phe [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50].....	482
6.8.4	Chiral-AD-H: (<i>R,R</i>)- und (<i>S,S</i>)-Diol-Leu [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]	483
6.8.5	Chiral-AD-H: (<i>R,R</i>)- und (<i>S,S</i>)-Epoxy-Ala [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]	484
6.8.6	Chiral-AD-H: (<i>R,R</i>)- und (<i>S,S</i>)-Epoxy-Phg [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50].....	485
6.8.7	Chiral-AD-H: (<i>R,R</i>)- und (<i>S,S</i>)-Epoxy-Phe [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50].....	486
6.8.8	Chiral-AD-H: (<i>R,R</i>)- und (<i>S,S</i>)-Epoxy-Leu [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]	487
7	Anhang	488
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	488
7.2	Literaturverzeichnis	493

1 Einleitung

Der Ausgangspunkt für die Suche nach einem neuen Arzneimittel ist die Leitstruktur. Eine solche Substanz besitzt bereits eine erwünschte biologische Wirkung, für den therapeutischen Einsatz, es fehlen aber noch bestimmte Moleküleigenschaften. Zu den Aufgaben der Medicinal Chemie gehört, dass durch gezielte chemische Variationen Strukturen hergestellt werden können, die diese Leitstruktur z.B. bezüglich Wirkstärke oder Selektivität des Rezeptors übertreffen. Das Ziel ist immer die Optimierung aller Eigenschaften, bis hin zum fertigen Wirkstoff für die Therapie oder Diagnostik. Ein großer Teil unseres Arzneimittelschatzes stammt direkt oder indirekt von Naturstoffen ab, von pflanzlichen, tierischen oder mikrobiellen Inhaltsstoffen als auch von endogenen Substanzen, z.B. Hormonen und Neurotransmittern. Nur wenige Naturstoffe sind selbst Arzneimittel geworden. Dazu gehören Morphin (1), Codein (2), Papaverin (3), Digoxin (4), Cyclosporin (5), Ephedrin (6) und der Proteaseinhibitor Aprotinin (Abbildung 1).

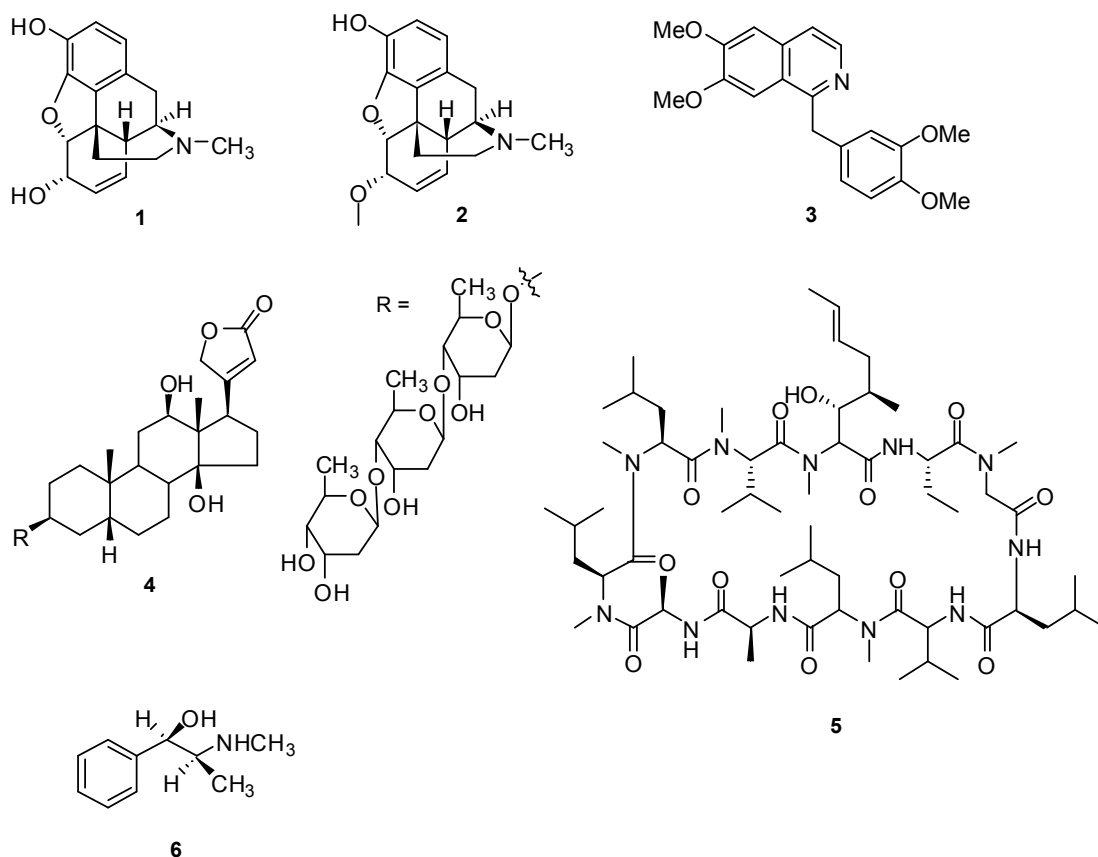


Abbildung 1: Natürliche Wirkstoffe als Arzneimittel, Morphin (1), Codein (2), Papaverin (3), Digoxin (4), Cyclosporin (5), Ephedrin (6).

Eine Leitstruktur ist erst der Anfang auf dem Weg zum Arzneimittel. In einem meist langwierigen, iterativen Prozess müssen die Wirkstärke, Spezifität und Wirkdauer optimiert werden. Jede Änderung der chemischen Struktur einer Substanz ändert auch ihre 3D-Struktur, die physikalisch-chemischen Eigenschaften und das biologische Wirkspektrum. Der isostere Ersatz von Atomen oder Gruppen, die Einführung hydrophober Gruppen, das Zerschneiden von Ringen bzw. die Einbindung flexibler Molekülteile in zyklische Strukturen und die Optimierung des Substitutionsmusters sind nur einige Möglichkeiten zur gezielten strukturellen Abwandlung einer Leitstruktur. Demensprechend folgt die Optimierung der Wirkstärke einer Substanz einer Arbeitshypothese und einem zyklischen Prozess von Versuch und Irrtum zur Verfeinerung dieser Hypothese. Bei der Struktur eines Wirkstoffs unterscheidet man zwischen.

- dem eigentlichen Pharmakophor, welches für die spezifische Targetbindung verantwortlich ist und bei dem eine chemische Variation meist nur in relativ engen Grenzen erfolgen kann,
- zusätzliche Gruppen („Haftgruppen“), welche eine höhere Affinität zum Target und damit eine höhere biologische Aktivität bewirken,
- weitere Gruppen, die nicht die Bindung, sondern nur die Lipophilie des Moleküls und damit dessen Transport und die Verteilung im biologischen System beeinflussen,
- sowie Gruppen, die erst abgespalten oder modifiziert werden müssen (Prodrug), um im Organismus die eigentliche Wirkform zu erzeugen (Abbildung 2).

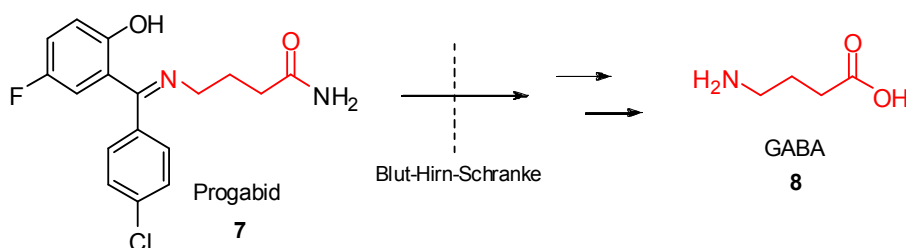


Abbildung 2: Progabid (7) kann als lipophiles Neutramolekül die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Nach metabolischer Freisetzung der Amino- und Carboxylgruppe wird es metabolisch in den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) (8) umgewandelt.

Eine wichtige Klasse von Zielproteinen bei der Entwicklung neuer Arzneimittel stellen in diesem Zusammenhang die Enzyme dar. Geschichte und Entwicklung der Enzymologie sind eng mit der Entdeckung der ersten Proteasen verknüpft. 1833 wurde der aus Malzlösung isolierte Amylase-Enzymkomplex von Jean-François Persoz und Anselm Payen mit dem

Begriff „Diastase“ (vom griechischen *diástasis*: Sonderung) belegt.^[1] Wilhelm Friedrich Kühne ersetzte diesen Ausdruck 1877 durch das Wort „Enzym“ (vom griechischen *en zyme*: in Sauerteig).^[2,3] Außerdem wurde eine in Verdauungssäften gefundene Substanz mit der Fähigkeit Proteine abzubauen beschrieben, die als „Trypsin“ bezeichnet wurde. Mit diesem Ereignis wurde eine neue Ära der Forschung eingeläutet, die sich der Isolierung, Reinigung und strukturellen Charakterisierung dieser neuartigen biologischen Katalysatoren widmete. Eine Vielzahl proteolytischer Enzyme wurde nicht nur in Verdauungssäften, sondern auch in anderen menschlichen Seren und Geweben, sowie in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen entdeckt. Einen Überblick über die Geschichte der Proteasen bietet ein Übersichtsartikel von Barrett.^[4] Mittlerweile existiert eine imposante Ansammlung exakter Daten über Strukturen, katalytische Mechanismen und Inhibition einer nahezu unüberschaubaren Menge von Proteasen. Etwa 500 bis 600 Proteasen wurden im humanen Genom gefunden.^[5] Proteasen (auch als Peptidasen oder Peptidhydrolasen bezeichnet) bewerkstelligen die Spaltung von Peptidbindungen durch Hydrolyse. Teilt man sie in verschiedene Klassen ein, so kann dies nach ihrem Spaltungsmuster oder dem Spaltmechanismus geschehen.

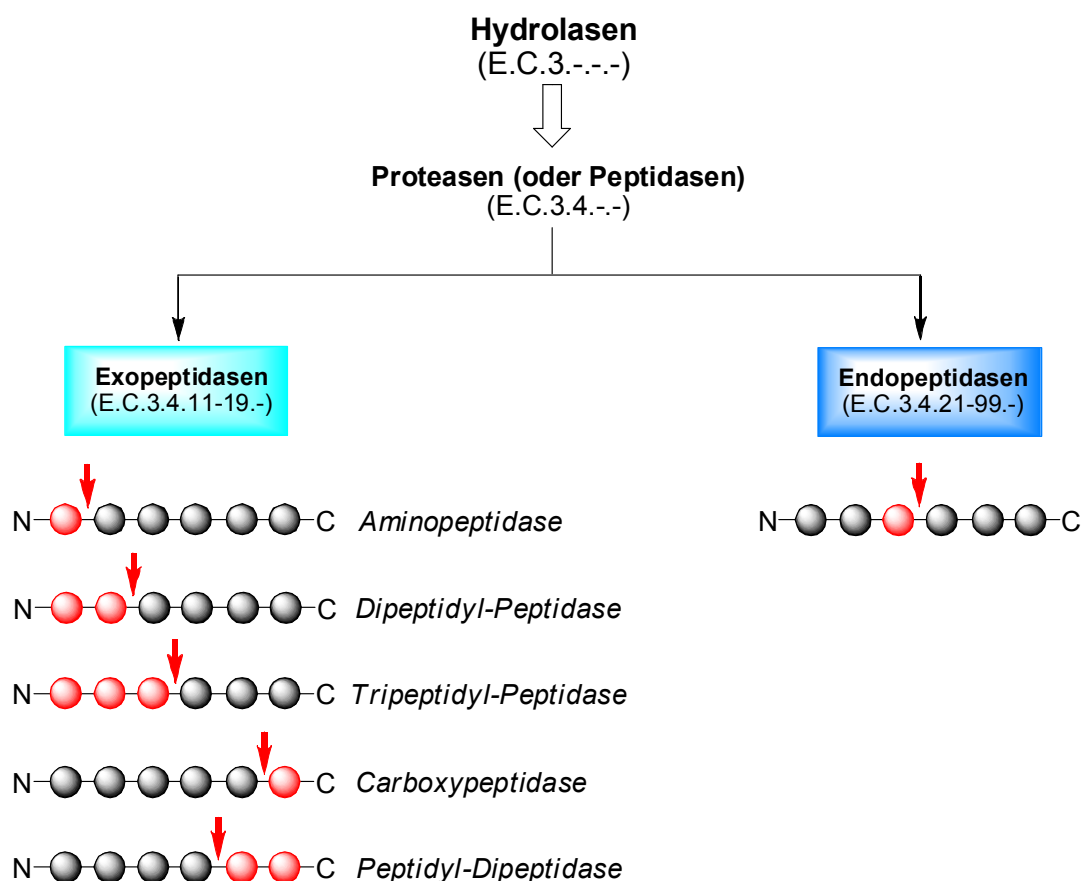


Abbildung 3: Einteilung der Proteasen nach ihrer Schnittspezifität. Die Schnittstellen innerhalb der Aminosäuresequenzen sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.^[6]

Aus den Proteasen in Abbildung 3 (oder Peptidasen) ergeben sich die Klassen der Endopeptidasen, welche inmitten eines Substrats spalten, und Exopeptidasen, die einzelne Aminosäuren oder kurze Peptide von den Termini der Substrate entfernen. Letztere können in Carboxy- und Aminopeptidasen eingeteilt werden, je nachdem an welchem Ende der Aminosäuresequenz die Spaltung eintritt (Abbildung 3). Die zweite Einteilung unterscheidet Proteasen nach ihren katalytischen Zentren in Serin-, Cystein-, Aspartat-, Threonin- und Metalloproteasen.^[5] Erst kürzlich wurde in *Aspergillus niger* var *macrosporus* eine Protease entdeckt, welche einen katalytisch aktiven Glutaminsäurerest besitzt.^[7] Barrett führte 1979 eine formelle Unterteilung ein, in der evolutionär weitläufig verwandte Proteasen in Clans eingruppiert werden, die wiederum in Familien näher verwandter Enzyme unterteilt sind. Diese Unterteilung wurde bis heute beibehalten und wird fortlaufend um neue Mitglieder erweitert.^[8-11] Da Proteasen ursprünglich in Verdauungssekreten und Gewebshomogenaten entdeckt wurden, waren sie lange Zeit gängiger Lehrmeinung zufolge ausschließlich an der „Entsorgung“ von Proteinen beteiligt. Mit der Entdeckung von Zymogenen und der Aufklärung der Blutgerinnungskaskade anfangs der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde jedoch offensichtlich, dass spezifische und limitierte Proteolyse zu den meisten fundamentalen biologischen Mechanismen beiträgt und eine wichtige Rolle in deren Regulation spielt. Mittlerweile ist bekannt, dass Proteasen entscheidende Bedeutung in vielen biologischen Prozessen wie zellulärer Entwicklung, Morphogenese, intrazellulärer Signaltransduktion, Befruchtung, Blutgerinnung, Zellteilung, -migration und -wachstum, Transkriptionskontrolle, Apoptose und der Aktivierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zukommt. Da die proteolytische Prozessierung von Proteinsubstraten im Gegensatz zu anderen posttranslationalen Modifikationen irreversibel ist, unterliegen Proteasen unter physiologischen Bedingungen strikten Regulationsmechanismen. Tatsächlich werden die meisten Proteasen zunächst in Form inaktiver Zymogene synthetisiert, die wiederum auf spezifische Signale hin aktiviert werden. Dies kann durch limitierte Proteolyse und/oder konformationeller Umwandlungen nach Bindung von Cofaktoren oder dem Entfernen von Inhibitoren geschehen.

Die Existenz solcher endogener Inhibitoren, welche teilweise spezifisch für ihre jeweilige Zielprotease sind, stellt einen wichtigen Schutzmechanismus vor unerwünschter proteolytischer Aktivität dar. Zusätzlich wird die Aktivität der meisten Proteasen durch ihre starke Abhängigkeit von den Bedingungen in ihrer Umgebung begrenzt. Hierbei spielen Faktoren wie der umgebende pH oder die Konzentration bestimmter Ionen, sowie die Lokalisierung innerhalb eng abgegrenzter Zellkompartimente wie zum Beispiel Lysosomen oder Umgebungen wie der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle. Viele Proteasen werden nur in bestimmten Geweben oder Körperflüssigkeiten exprimiert, eng gekoppelt an ihre physiologische Funktion. Mangelnde Regulation der Proteolyse bringt meist verheerende

Konsequenzen mit sich. Eine Dysregulation der Proteaseaktivität im Embryonalstadium kann zu einer großen Anzahl schwerwiegender Krankheitsbilder führen. Die Mechanismen der Infektion sowie der Vermehrung vieler pathogener Organismen, wie mehr- und einzelliger Parasiten, Pilze, Bakterien und Viren, basieren vielfach auf der Wirkung von Proteasen oder aber auf der Inhibition wirtseigener Proteasen.

Daher stellen sowohl humane als auch parasitäre Proteasen interessante Ziele für therapeutische Behandlungen dar. Die Erfolgsgeschichte von Captopril (**10**) und verwandten ACE-Inhibitoren zur Behandlung von Bluthochdruck und die Verwendung von HIV-Proteasehemmstoffen, Viracept (**9**), Tipranavir (**11**) zur Unterstützung der Therapie HIV-infizierter Patienten seien hier als Beispiele angeführt (Abbildung 4).

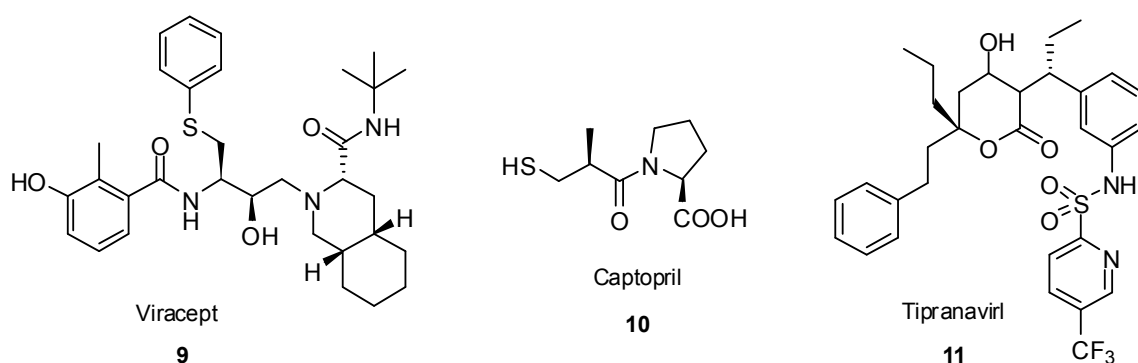


Abbildung 4: Captopril® (**10**) gilt als erstes Beispiel für rationales Wirkstoff-Design. Weitere strukturbasierende Wirkstoffentwicklungen sind z.B. der HIV-Protease-Inhibitor Viracept® (**9**) und Tipranavir (**11**).

Im Licht solcher Errungenschaften wird die Bedeutung fortgesetzter Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der Proteasen und ihrer Inhibitoren deutlich. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung spezifischer Inhibitoren für papainähnliche Cysteinproteasen, einer wichtigen Klasse regulatorischer Enzyme.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Cysteinproteasen

Peptidasen, deren katalytische Wirkung auf der Aminosäure Cystein basiert, werden in die Familie der Cysteinproteasen (auch als Sulfhydryl- oder Thiolproteasen bezeichnet) eingruppiert. In allen Cysteinproteasen sind die drei Aminosäuren der katalytischen Triade, Cystein, Histidin und Asparagin konserviert (Abbildung 5).

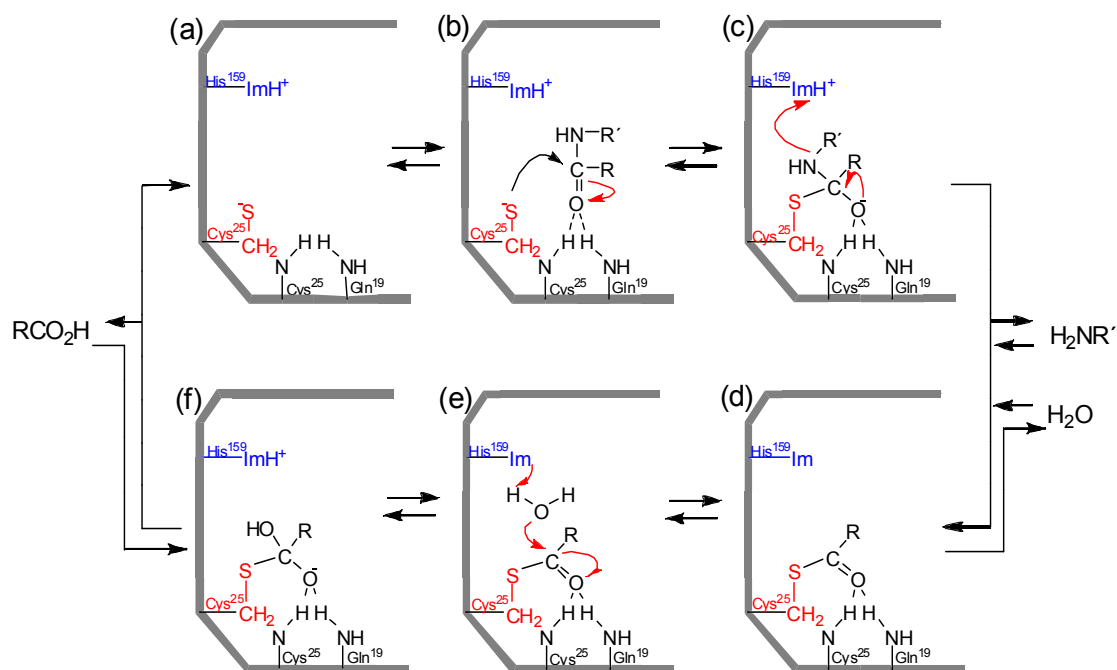


Abbildung 5: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus der papainähnlichen Cysteinproteasen.

Zunächst assoziiert freies Enzym (a), unter Ausbildung eines Michaelis-Komplexes (b) das Substrat. Da im neutralen bis sauren Milieu die aktive Form des Enzyms als $\text{Cys}^{25}\text{-S}^- / \text{His}^{159}\text{-ImH}^+$ vorliegt, folgt der nucleophile Angriff des Thiolatanions auf den Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung. Es bildet sich unter Konformationsänderung des aktiven Zentrums ein tetraedrischer Übergangszustand (c) aus, der durch das sogenannte Oxyanionen-Loch stabilisiert wird. Dabei wird der Carbonylsauerstoff über Wasserstoffbrückenbindungen zum Rückgrat-NH des Cys^{25} und zur NH_2 -Gruppe des Gln^{19} fixiert. Das Imidazolium-Ion, welches durch die Protonenaufnahme von Cys^{25} entstanden ist, wird vom

benachbarten Asn¹⁷⁵ (nicht gezeigt) über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Im Folgenden fungiert die entsprechend Seitenkette von His¹⁵⁹ als Protonendonator und bewirkt damit den Zusammenbruch des tetraedrischen Übergangszustands. Unter Freigabe des ersten Reaktionsproduktes, R'NH₂, bildet sich ein Acyl-Enzym-Komplex (d), der im zweiten Teil der Proteolyse durch ein Wassermolekül aus dem Lösungsmittel nucleophil angegriffen wird (e). Dies geschieht unter Ausbildung eines weiteren tetraedrischen Übergangszustandes (f), wobei His¹⁵⁹ ein Proton vom Wassermolekül abspaltet. Bei dieser Deacylierung wird das zweite Reaktionsprodukt, RCOOH, gebildet, dessen Freisetzung schließlich zur Regenerierung des freien Enzyms führt.^[12,13]

Im Hinblick auf ihre evolutionäre Entwicklung werden Cysteinproteasen in sieben Clans unterteilt (Tabelle 1), welche insgesamt über 40 Familien enthalten.^[9,14] Clan CA, die größte Untergruppe der Cysteinproteasen, umfasst alle Proteasen, die strukturelle Homologien zu Papain aufweisen. Sieht man von den weitreichenden Unterschieden innerhalb des Clans ab, ist allen Mitgliedern die Struktur der katalytischen Einheit gemein. Diese ist in einer Einbuchtung zwischen zwei Domänen gelagert, die jeweils einen Teil der katalytischen Domäne enthalten.^[15] Die papainähnlichen Cysteinproteasen sind weiter in Familie C01 (Cathepsine) und C02 (Calpaine) unterteilt. Im folgenden Abschnitt werden die Cathepsine näher betrachtet.

Tabelle 1: Einteilung der Cysteinproteasen in Clans.^[14]

Clan	Stammenzym
CA	Papain
CD	Caspase-1
CE	Adenain
CF	Pyroglutamylpeptidase I
CH	Hedgehog Protein
CL	Sortase B
C-	nicht zugeordnet

2.2 Cathepsine

Die nach dem griechischen Wort *kathepsô* für „verdauen“ benannten Cathepsine sind eine Familie ubiquitär verbreiteter Proteasen. Ihre Mitglieder konnten in allen Tieren und Pflanzen identifiziert werden, homologe Enzyme existieren sogar in einzelligen Bakterien und Viren.^[16] Bisher wurden elf humane Cystein-Cathepsine (B, C, F, H, L, K, O, S, V, X und W) auf DNA-

Ebene identifiziert, und bis auf Cathepsin O und W mittels Röntgenstrukturanalyse charakterisiert.^[17,18] Bei den humanen Cathepsinen D, E, A und G handelt es sich um Aspartyl-, beziehungsweise Serinproteasen, die hier nicht weiter behandelt werden sollen.

2.2.1 Strukturmodelle der Cathepsine

Allen Cystein-Cathepsinen (im Weiteren als „Cathepsine“ bezeichnet) ist gemeinsam, dass sie aus einem aus 10 bis 20 Aminosäuren bestehenden Signalpeptid, einem Propeptid und einer katalytischen Domäne bestehen. Sie besitzen eine Molekülmasse von 22-28 kDa, mit Ausnahme des tetrameren Cathepsin C mit einer Molekülmasse von 200 kDa.^[19] Die Propeptide variieren in Ihrer Länge zwischen 36 Aminosäuren in humanem Cathepsin X und 315 Aminosäuren in Falcipain-1, aus *Plasmodium falciparum*. Das Propeptid verläuft hierbei in umgekehrter Orientierung der Substrat-Bindung in gestreckter Konformation durch den katalytischen Spalt und blockiert die katalytische Aktivität der Protease, wobei der katalytische Spalt bereits korrekt formiert ist. Auch nach ihrer Abspaltung können die Propeptide als hochaffine reversible Inhibitoren eine vorzeitige Aktivierung der Protease verhindern,^[20-24] wobei ihre Spezifität in manchen Fällen auf die gesamte Familie der Cathepsine ausgedehnt ist, so dass auch verwandte Enzyme inhibiert werden.^[21,22,25]

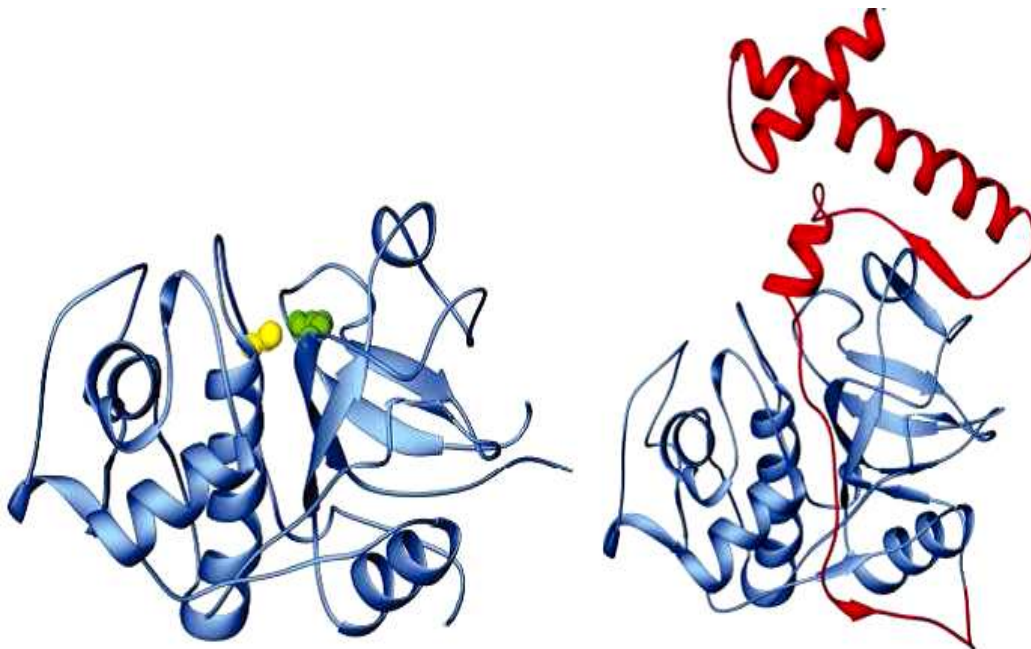


Abbildung 6: Bänder-Darstellung der Strukturen von Cathepsin L (links) und Procathepsin L (rechts). Die Proteasedomänen sind jeweils blau, das Propeptid rot eingefärbt. Das katalytische Cystein (gelb) und Histidin (grün) sind in der Kalotten-Darstellung eingefügt.^[26]

Zusätzlich zu ihrer inhibitorischen Funktion können die Propeptide als eine Art Gerüst die Faltung der katalytischen Domäne unterstützen^[27-29] oder als Chaperone den Transport des Proenzyms in das endosomal-lysosomale Kompartiment unterstützen.^[30,31] Die katalytischen Domänen dieser papainähnlichen Cysteinproteasen bestehen aus etwa 220 bis 260 Aminosäuren, mit der Ausnahme einiger parasitärer Proteasen, deren zusätzliches C-terminales Fragment vermutlich an der Erkennung der Wirtsproteine beteiligt ist.^[32] Generell ist die dreidimensionale Struktur (Abbildung 7) aller sechs humanen Cathepsine, bestehend aus einer L (für *left*) und R-Domäne (für *right*) sehr ähnlich.^[33] Cys²⁵ (Papain-Nummerierung) des aktiven Zentrums befindet sich in der L-Domäne, während His¹⁵⁹ der katalytischen Triade in der R-Domäne lokalisiert ist. Das katalytisch aktive Cys²⁵ ist in eine stark konservierte Sequenz, CGSCWAFS, eingebettet, ähnlich wie die beiden anderen Aminosäuren der katalytischen Triade. Der pKs der katalytischen Thiolgruppe beträgt etwa 2,5-3,5.^[34] Auch in anderen Regionen weisen die Mitglieder der Familie einen hohen Grad an Homologie auf. Insgesamt sind die Bindungsstellen der Cathepsine nicht besonders ausgeprägt strukturiert. Nur S2, S1 und S1' bilden definierte Taschen aus, während S4, S3, S2' und S3' eher Bindungsareale darstellen.^[35] Die Cathepsine können aufgrund von Sequenz-Homologien weiter in Cathepsin B-, Cathepsin L- und Cathepsin F-ähnliche Proteasen unterteilt werden. Cathepsin L-^[36] und F-ähnliche^[37] Proteasen zeichnen sich durch konservierte Regionen innerhalb ihrer Propeptide aus, erstere tragen einen „ERFNIN“-Einschub in ihrem Propeptid.

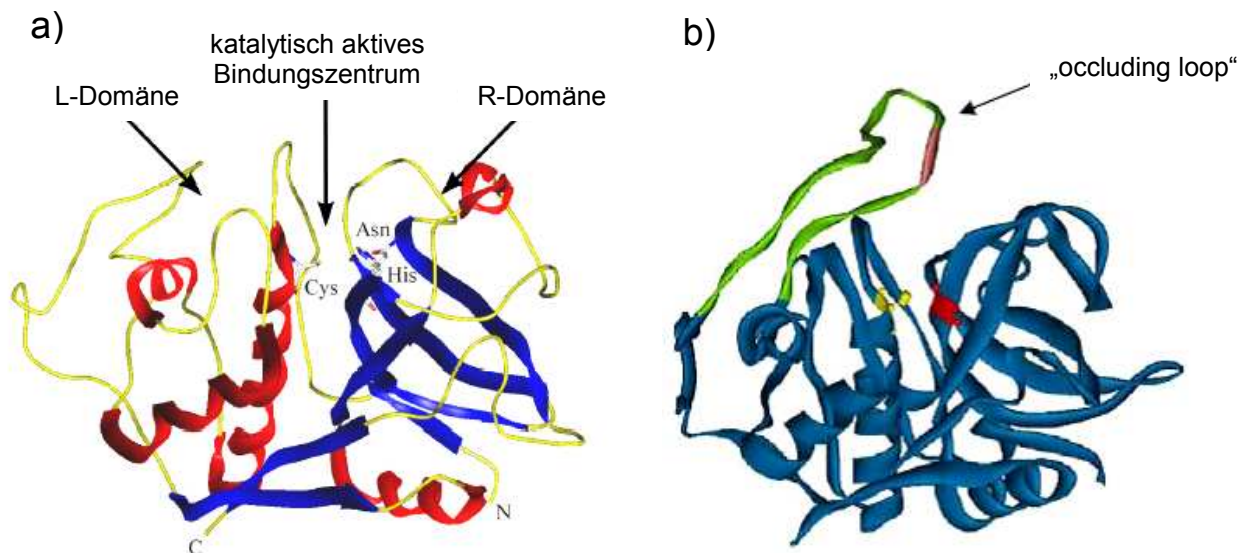


Abbildung 7: Bänder-Darstellung der Proteinstrukturen von Cathepsin B. (a) Die α-Helices sind rot, und die β-Faltblätter blau eingefärbt (PDB-Eintrag: 9PAP^[38]). (b) Die „occluding loop“ ist in grün, das katalytische Cystein (gelb) und Histidin in rot dargestellt (PDB-Eintrag: 1HUC).^[35]

Cathepsin B-ähnliche Enzyme besitzen eine sogenannte *occluding loop* („Verschlusschleife“), eine Insertionssequenz von etwa 20 Aminosäuren^[39] zwischen dem katalytischen Cystein und dem konservierten Pro-Tyr-Motiv, der zwei benachbarte Histidinreste, His¹¹⁰ und His¹¹¹ (humanes Cathepsin B), enthält. Diese treten mit der C-terminalen Carboxylgruppe der Substrate in Wechselwirkung, verankern sie in der S2'-Tasche, und bestimmen somit die Carboxydipeptidase-Aktivität von Cathepsin B.^[39] Die Protease ist jedoch nicht strikt auf Exopeptidase-Aktivität beschränkt. Die Präferenz an den Termini oder in endo-Position eines Substrats zu spalten wechselt durch konformationelle Änderungen der *occluding loop* in Abhängigkeit des pH.^[40,41] Bei niedrigem pH wird dieser zur Oberfläche der Protease gezogen und blockiert somit einen Teil des katalytischen Spalts, während bei höherem pH seine konformationelle Freiheit größer ist und weitere Bindungsstellen zugänglich werden.^[42] Eine Studie mit Mutationen an verschiedenen Stellen der Protease zeigte, dass die Salzbrücke zwischen His¹¹⁰ und Asp²² den entscheidenden Beitrag zur Fixierung der *occluding loop* in der geschlossenen Konformation liefert.^[43] Hieraus ergibt sich auch die beobachtete pH-Abhängigkeit synthetischer Inhibitoren für Cathepsin B.^[38] Messungen neueren Datums bestimmten einen pKs von 4.4 für die Konformationsänderung,^[39] so dass bei einem lysosomalen pH von etwa 4,5 - 5,0 eine gemischte Exo- und Endopeptidase-Aktivität von Cathepsin B anzunehmen ist.

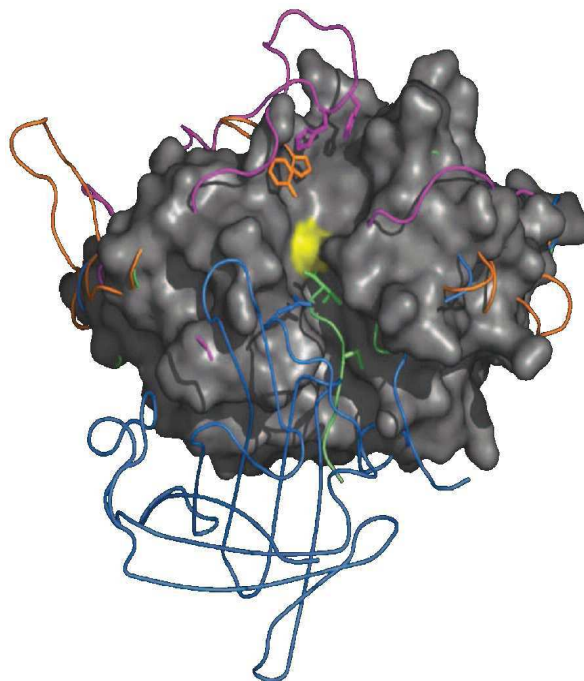


Abbildung 8: Strukturelemente der Exopeptidasen Familie C01. Zusätzliche Ketten und Stäbchenmodelle essentieller Seitenketten der Cathepsine H (grün), C (blau), B (pink) und X (orange) sind über die Struktur von Cathepsin L gelegt. Das katalytische Zentrum ist gelb eingefärbt.^[44]

Die Carboxymonopeptidase-Aktivität von Cathepsin X wird durch den aus nur drei Aminosäuren bestehenden sogenannten „*mini loop*“ bestimmt,^[45,46] der über His²³⁴ den Carboxy-Terminus des Substrats fixiert. Die Aminomonopeptidase-Aktivität von Cathepsin H ist auf der sogenannten *Mini-Kette* begründet. Dieses aus dem Propeptid stammende Oktapeptid ist über eine Disulfidbrücke am Enzym befestigt und blockiert die S2-Bindungstasche. Die Carboxyl-Funktion des C-terminalen Threonin tritt mit dem Amino-Terminus des Substrats in Wechselwirkung und fixiert diesen.^[35] Bei Cathepsin C liegen vier voneinander katalytisch unabhängige aktive Zentren auf der Oberfläche des Komplexes; der Zusammenhalt der Untereinheiten wird von der sogenannten Ausschlussdomäne gewährleistet. Diese zusätzliche Domäne blockiert zudem das katalytische Zentrum nach der S2-Tasche, in welcher der Amino-Terminus des Substrats über ein essentielles Chlorid gebunden wird, weshalb Cathepsin C als Aminodipeptidase wirkt. Die Cathepsine F, L, K, O, S und V sind Endopeptidasen.

2.2.2 Physiologie der Cathepsine

Im Allgemeinen sind Cathepsine nicht besonders selektiv in Bezug auf die Auswahl ihrer Substrate. Die Prozessierung eines bestimmten Substrats wird vornehmlich durch seine Co-Lokalisation mit der Protease bestimmt. Es zeigte sich, dass der Modus der Substratbindung nicht strikt konserviert ist. Aufgrund der räumlichen Freiheiten im Bereich der Bindungsareale außerhalb von S2, S1 und S1' bindet jedes Substrat auf individuelle Weise.^[35] Lange Zeit wurde daher den humanen Cathepsinen eher geringe Aufmerksamkeit geschenkt, da man annahm, sie seien ausschließlich am unspezifischen lysosomalen Abbau von Proteinen beteiligt. Studien mit Protease-negativen Mäusen zeigten jedoch, dass die Enzyme dieser Familie wichtige und spezifische Aufgaben in verschiedenen Bereichen,^[47] wie Antigenpräsentation, Abbau und Umstrukturierung von Knochen und die Aktivierung von Zymogenen erfüllen, und führten so in den 1980er Jahren zu einem Paradigmenwechsel. Cathepsine werden als pre-Proenzyme exprimiert und mit Hilfe des Signalpeptids über den Mannose-6-Phosphat-Weg durch die ER-Membran zu den Lysosomen transportiert,^[48,49] wo sie durch Abspaltung des Propeptids aktiviert werden.^[50,51] Sie sind jedoch nicht strikt lysosomal, sondern besitzen teilweise wechselnde Aufenthaltsorte zwischen Phagosomen, Endosomen und Lysosomen. Cathepsin B, L und H sind ubiquitär in Säugetiergeweben,^[52] andere Cathepsine hingegen werden gewebsspezifisch exprimiert. So wird Cathepsin S in aus dem Knochenmark stammenden Immunzellen gefunden, in denen es seine Aufgabe bei der Prozessierung der invarianten Kette des MHC Klasse II verrichtet.^[53,54] In anderen Zellen übernehmen Cathepsin L und F diese Funktion.^[55,56] Weitere Funktionen von Cathepsin L sind mit der epidermalen Homöostase und der Morphogenese der Haarfollikel verknüpft.^[57]

Cathepsin K ist in Osteoklasten lokalisiert, wo es an Knochenabbau und -umstrukturierung beteiligt ist.^[30,58] Cathepsin V wird vorrangig in Thymus, Hoden und der Cornea exprimiert.^[37] Cathepsin W (Lymphopain) kommt ausschließlich in CD8+ T-Lymphozyten vor, seine Funktion ist jedoch weiterhin unklar.^[59] Studien mit Cathepsin C-negativen Mäusen ergaben, dass diese Protease die Prozessierung einer Reihe von Proenzymen bewerkstelligt.^[60,61]

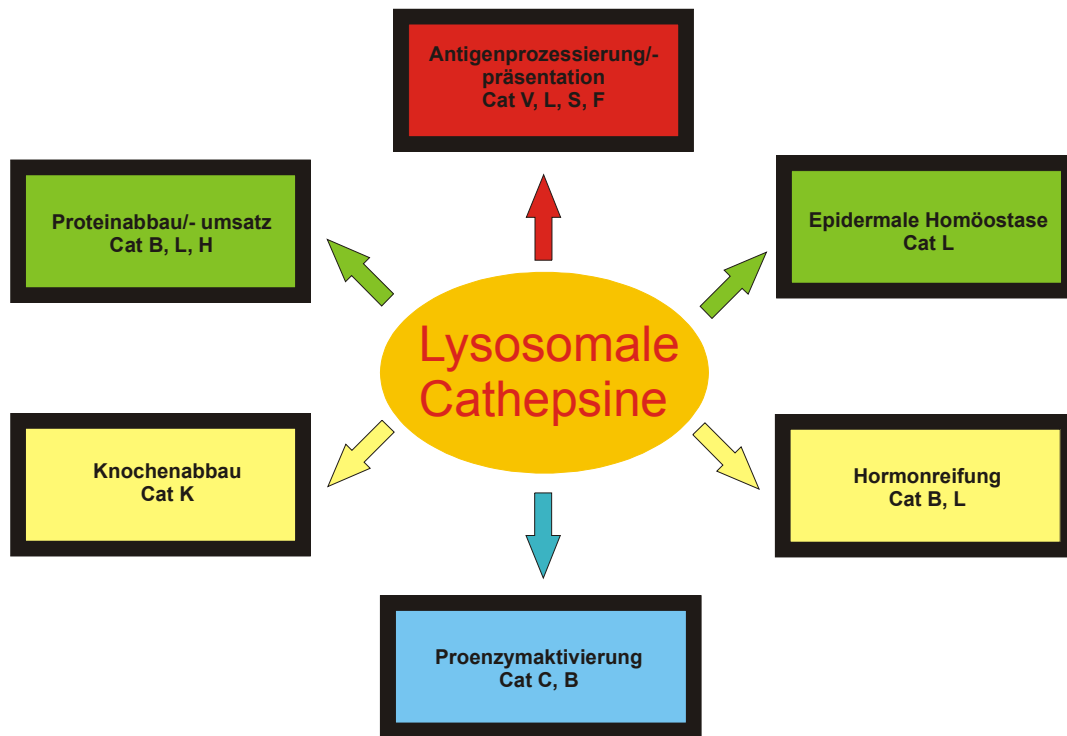


Abbildung 9: Aufteilung der primären physiologischen Aufgaben der Cathepsine.

Da das pH-Optimum der Cathepsine im sauren Milieu liegt, erreichen sie im lysosomalen Kompartiment ihre maximale Aktivität,^[52] mit Ausnahme von Cathepsin S, welches bei neutralem pH maximal aktiv ist.^[62] Tatsächlich büßen die Säugetier-Cathepsine mit Ausnahme von Cathepsin S bei neutralem pH rasch an Aktivität ein,^[63] was einen möglichen Schutzmechanismus vor ungewollt in das Zytosol ausgeströmten Proteasen darstellt. Im Gegensatz dazu zeigen viele parasitäre Cysteinproteasen maximale Aktivität bei neutralem oder leicht alkalischem pH,^[64] wie er im extrazellulären Raum auftritt. So können Cathepsine parasitären Ursprungs ihre Wirkung bei der Invasion von Gewebe und Zellen, der Nahrungsaufnahme, Protein und Matrixdegradation, beim Schlüpfen und der Umgehung des wirtseigenen Immunsystems entfalten.^[65] Die Aktivität der Cathepsine wird *in vivo* zusätzlich durch die Proteine der Cystatin-Superfamilie kontrolliert. Diese werden unterteilt in Stefine (Familie 1), Cystatine (Familie 2) und Kininogene (Familie 3).^[39] Ihre Hauptaufgabe ist der Schutz des Organismus vor, durch unregelmäßige Aktivität der Cathepsine verursachten Schäden, sowie vor pathogenen Cathepsinen von Parasiten.^[66,67] Eine interessante

Auswirkung nicht-lysosomaler Aktivität von Cathepsinen ist, dass die Cathepsine B, L und D Apoptose auch dann auslösen können, wenn der durch Caspasen vermittelte programmierte Zelltod aufgrund von Mutationen unterbunden ist, wie beispielsweise in Tumorzellen.^[68] Tatsächlich werden viele Tumore durch ihre Transformation und Immortalisierung hypersensitiv für die durch den Tumornekrosefaktor (TNF) ausgelöste Cathepsin B-vermittelte Apoptose.^[69] Hier besteht prinzipiell die Möglichkeit, Cathepsine durch Stimulation ihrer Expression oder Ausschalten der Inhibitoren nutzbar zu machen. Die Beteiligung der Cathepsine an alternativen Wegen der Apoptose beruht auf ihrer Freisetzung nach Permeabilisierung der Lysosomen-Membran durch Stimuli wie lysosomotrope Agenzien,^[70,71] UV-Licht,^[72,73] Sphingosin,^[74] D-Galactosamin,^[75] reaktive Sauerstoffspezies (ROS)^[76] und Substanzen die p53-unabhängige Apoptose auslösen,^[77] sowie indirekt durch Caspase 8, welche nach Rezeptorbindung von TNF- α aktiviert wird.^[78-81] Die Apoptose wird über Prozessierung des Proteins Bid eingeleitet, welches die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien stimuliert. Dieses wiederum aktiviert Caspase 9, die über Caspase 3 die apoptotische Kette in Gang setzt.^[82]

2.2.3 Pathophysiologie der Cathepsine

Mit einem Cathepsin-Defizit werden bisher nur äußerst seltene Krankheitsbilder in Verbindung gebracht. Es handelt sich zum einen um die Pycnodysostose, eine Knochendysplasie, die durch Mangel an Cathepsin K hervorgerufen wird,^[83] zum anderen um das Papillion-Lefevre-Syndrom, einer durch Cathepsin C-Mangel hervorgerufenen Peridonthopathie.^[84] Die Mehrzahl der mit einer Veränderung der Cathepsinaktivität einhergehenden Erkrankungen zeichnen sich jedoch durch eine Überexpression einer oder mehrerer dieser Proteasen aus. Eine Reihe von Erkrankungen wie Osteoporose,^[85,86] Arthritis,^[87-90] Morbus Alzheimer^[91] sowie die Invasivität und Metastasierung von Tumoren^[92-94] werden ebenfalls hiermit in Verbindung gebracht (Tabelle 2). Zusätzlich spielen Cathepsine eine wichtige Rolle beim Befall von Wirtsorganismen durch Parasiten. Daher ruhen auf der gezielten Inhibierung dieser Proteasen Hoffnungen zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheitsbildern. Das Krankheitsbild der Osteoporose beispielsweise zeichnet sich durch ein Ungleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau aus, was eine erhöhte Brüchigkeit der Knochensubstanz zur Folge hat. Zusammen mit Matrix-Metalloproteasen spielt Cathepsin K hierbei eine Rolle beim Abbau von Typ-I Kollagen,^[86] welches die Knochensubstanz stabilisiert und über 20% der Knochenmasse ausmacht. Eine ähnliche Rolle kommt den Cathepsinen B, L und S vermutlich im Bereich arthritischer Erkrankungen wie Osteoarthritis^[87,88] und rheumatoider Arthritis^[82] zu. Hier wird Typ-I Kollagen^[95,96] und das Proteoglycan Aggrecan^[97,98] durch Chondrozyten abgebaut, was die Schädigung des

Bindegewebes in Gelenken zur Folge hat. Die schädigende Wirkung der Cathepsine beruht hierbei entweder direkt auf dem Abbau der extrazellulären Matrix,^[99] oder indirekt auf der Aktivierung von pro-uPA und der mit dieser verknüpften proteolytischen Kaskade.^[100] Eine nicht-lysosomale Aktivität von Cathepsinen spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei Tumorerkrankungen. In entarteten Zellen, besonders an der Invasionsfront der Tumoren, sind die Lysosomen oftmals zum Zellrand hin verschoben, so dass deren Inhalt in den extrazellulären Raum freigesetzt wird.^[93] Im Mausmodell zeigten sich Verringerungen des Wachstums, der Invasivität und Angiogenese von Tumoren in denen Cathepsine chemisch^[101] oder auf Expressionsebene^[102] unterdrückt wurden. In verschiedenen Tumorgeweben, wie Gehirn-, Colorectal- und Prostatatumoren^[92,93] konnte eine Überexpression von Cathepsin B beobachtet werden, die meist mit dem Übergang in stärker maligne Phasen,^[103] verstärkter Invasivität^[104-106] und allgemein einer Verschlechterung der Prognose einhergeht.^[107]

Tabelle 2: Pathologische Veränderungen aufgrund erhöhter Cathepsin-Konzentrationen.

Cysteinprotease	Krankheit	Erhöhung der Enzymkonzentration	Biologisches Material
Cathepsin B, L	Mamma-Karzinom	+	Krebsgewebe und Zelllinien
Cathepsin B, L, H	Prostata-Karzinom	+	Krebszellkulturen
Cathepsin B, L	Lungen-Krebs	+	Krebsgewebe
Cathepsin H	Lungen-Krebs	+	Serum
Cathepsin B, L, H, S	Alzheimer, Demenz, Parkinson	+	Pathologisch veränderte Gehirnregionen
Cathepsin B, L, H, S	Rheumatoide Arthritis	+	Plasma

Neben den humanen Cathepsinen wurde auch eine Vielzahl von Cysteinproteasen in weiteren Organismen identifiziert. In Tabelle 3 ist eine Auswahl an verschiedenen parasitären, bakteriellen und viralen Cysteinproteasen und deren Vorkommen aufgeführt.^[108,109] Zu den parasitären Cysteinproteasen gehören z.B. die Falcipaine. Sie werden von dem Erreger *Plasmodium falciparum* exprimiert, der eine der gefährlichsten Arten der Malariaerreger darstellt. Die Falcipaine nehmen dabei unterschiedliche Aufgaben wahr. So wurde festgestellt, dass das Falcipain 1 im sexuellen Zyklus des Parasiten in der die Krankheit übertragenden Anopheles-Mücken bei der Produktion der Oocysten eine wichtige Rolle einnimmt.^[110,111] Im Gegensatz dazu sind die Falcipaine 2a/b und 3 im asexuellen Zyklus, der sich in menschlichen Erythrozyten abspielt, z.B. an der Hydrolyse von Hämoglobin durch die Trophozoiten beteiligt.^[16,112] Die in diesem Abschnitt beispielhaft beschriebenen Funktionen und Auswirkungen von Fehlfunktionen der Cathepsine verleihen der eingehenden Untersuchung ihrer Wirkmechanismen ebenso wie der Entwicklung neuer Konzepte zur Findung selektiver Wirkstoffe für diese Proteasen große Tragweite. Ihre gezielte Inhibierung

und Modulation bietet neue Chancen zur Behandlung einer großen Zahl von Krankheitsbildern, die mit ihrer abnormen Aktivität verbunden werden.

Tabelle 3: Übersicht der parasitären und bakteriellen Cysteinproteasen.

Organismus	Enzym	Funktion	Erkrankung
<u>Parasit</u>			
<i>Plasmodium falciparum</i>	Falcipain 1	Oocysten-Produktion (sexueller Zyklus)	Malaria
	Falcipain 2a/b	Hydrolyse von Hämoglobin in den Trophozoiten (asexueller Zyklus)	
	Falcipain 3		
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Rhodesain	Replikation des Parasiten	Schlafkrankheit
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzipain	Ernährung des Parasiten	Chagas-Krankheit
<u>Virus</u>			
Transmissible Gastroenteritis Coronavirus (TGEV)	TGEV M ^{pro}	virale Replikation und Transkription	Durchfallerkrankung (bei Schweinen)
humanes SARS-Coronavirus	SARS-CoV M ^{pro}	virale Replikation und Transkription	SARS
<u>Bakterium</u>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sortase	Transpeptidase-Aktivität bei Zellwandaufbau, Virulenzfaktor	bakterielle Infektion

2.3 Inhibitoren der papainähnlichen Cysteinproteasen

Mit der Erkenntnis, dass den Cathepsinen in einer Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse eine Schlüsselrolle zukommt, erwuchs das Interesse an hochaffinen und spezifischen Inhibitoren für diese ungewöhnlichen Proteasen. Unspezifische Protease-Inhibitoren wie Iodessigsäure, 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), N-Ethylmaleinimid, Isokumarine und Diisopropylphosphofluoridat inhibieren Cathepsine und wurden in den ersten Studien eingesetzt. Hierbei stellt sich oft das Problem, Moleküle zu entwickeln, die trotz der großen strukturellen Ähnlichkeiten selektiv nur eines der Enzyme hemmen. In den letzten Jahren wurden verschiedene Verfahren und Ansätze entwickelt, um Leitstrukturen aus Reihenuntersuchungen von Substratbibliotheken, sowie natürliche und synthetische Cysteinprotease-Inhibitoren zu optimieren. Da einige der Cathepsine ubiquitär im Organismus anzutreffen sind, ist es oftmals schwierig, gezielt einzelne Gewebe, wie das eines Tumors anzusprechen. Dies kann durch die Wahl geeigneter Applikationsformen oder

durch selektive Adressierung des Wirkstoffs,^[112] beispielsweise mit Antikörpern, geschehen. Im Folgenden wird ein Einblick in die Studien synthetischer und natürlicher Inhibitoren für die Familien der Cathepsine gegeben. Verschiedene chemische Strategien werden aufgezeigt und unterschiedliche Verfahren zur Entdeckung neuer vielversprechender Moleküle beleuchtet, um so einen Überblick über den Stand der Forschung zu geben. Da im Rahmen dieser Arbeit peptidische Inhibitoren verwendet wurden, ist ihnen besonderes Augenmerk gewidmet; Analoga des Epoxids E-64 (**21**) werden in einem gesonderten Abschnitt behandelt. Die meisten bisher bekannten Inhibitoren von Cysteinproteasen wurden über den klassischen substratbasierenden Weg entwickelt. Dieser passt den Aufbau des Inhibitors einem bekannten Substrat an, um eine möglichst gute Affinität zum Enzym zu gewährleisten und benötigt i. d. R. eine reaktive Kopfgruppe. Der auf dem Substrat basierende Teil des Inhibitors besteht meist aus einer Peptidkette, die als Erkennungssequenz dient, um die reaktive Kopfgruppe im katalytischen Zentrum des Enzyms zu positionieren. Der Nachteil dieses Entwicklungskonzeptes ist allerdings, dass die dem Substrat ähnlichen Peptide leicht einer hydrolytischen Spaltung unterworfen sind und damit nur eine geringe Bioverfügbarkeit aufweisen. Daher versucht man diese Peptide durch Abwandlung des Peptidrückgrats, der Aminosäuresequenz oder durch Einbau nicht-proteinogener Aminosäuren strukturell zu verändern, und so in Peptidmimetika umzuwandeln. Die elektrophile Kopfgruppe, der „*Warhead*“, soll dann die Thiol-Funktion des katalytischen Zentrums blockieren, und somit zur Inhibierung des Enzyms führen. Man unterscheidet zwischen kovalent bindenden und nicht-kovalent bindenden Inhibitoren. Es sind allerdings nur wenige Inhibitoren beschrieben, die ausschließlich über nicht-kovalente Wechselwirkungen an die Cysteinproteasen binden, darunter sind Peptidsulfone und Sulfon-Derivate.^[113,114] Bei den kovalent bindenden Inhibitoren unterscheidet man zwischen reversiblen und irreversibel hemmenden Verbindungen. Setzt man Aldehyde, Ketone oder α -Ketosäuren als reaktive Kopfgruppe ein, so findet durch Bildung eines Halbacetals bzw. -ketals eine reversible Hemmung statt. Im Falle von Fluormethyl- und Diazomethylketonen, Epoxysuccinaten, Aziridinen, Acylomethylketonen oder O-Acylhydroxamaten wird die Cysteinprotease durch Alkylierung oder Acylierung irreversibel gehemmt.^[115]

2.3.1 Das katalytische Zentrum nach Schechter und Berger

Nach dem Modell von Schechter und Berger werden die Bindung an den katalytischen Zentren von Proteasen in einzelne Taschen unterteilt, denen jeweils eine bestimmte Aminosäureseitenkette ihrer Substrate oder entsprechende Strukturelemente der Inhibitoren zugewiesen werden (Abbildung 10).^[116] Auf der aminoterminalen („ungestrichenen“) Seite der Schnittstelle befinden sich die Aminosäureseitenketten P1, P2, P3... des

Substrats, beziehungsweise die zugehörigen S1-, S2-, S3-,...Bindungstaschen des Enzyms. Auf der carboxyterminalen („gestrichenen“) Seite die entsprechenden Bereiche P1', P2', P3'..., beziehungsweise S1', S2', S3'... Gezählt wird jeweils von der zu spaltenden Peptidbindung weg zu den Enden des Substrats hin.

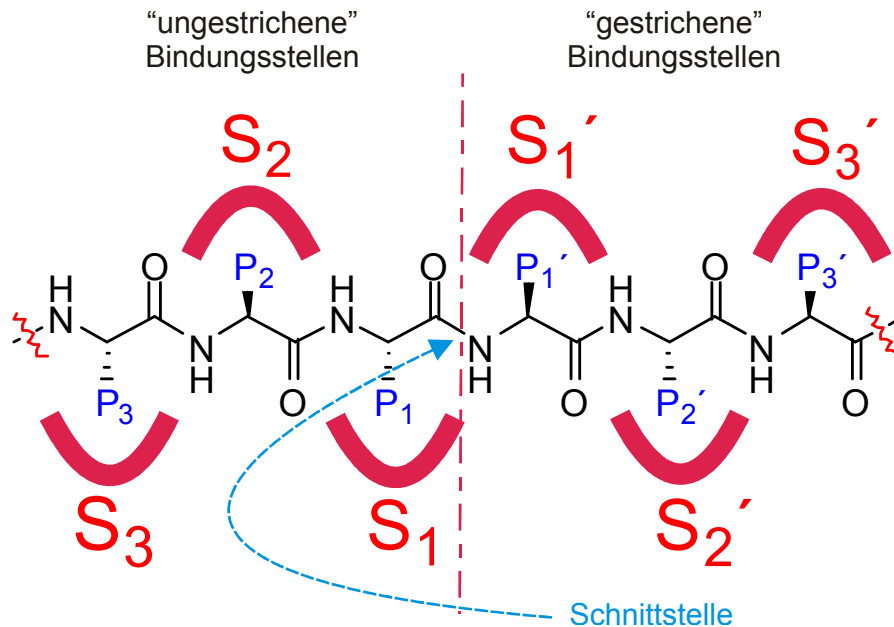


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Substratbindung nach Schechter und Berger.^[116] In blau sind jeweils die Aminosäureseitenketten von P3 bis P3' des Substrats angedeutet, in rot die korrespondierenden Bindungstaschen S3 bis S3' der Protease.

Die Mehrzahl der Inhibitoren für Cysteinproteasen bilden über eine kovalente Bindung ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom nach Angriff des Nucleophils aus, ähnlich wie bei der Substrathydrolyse (s. Abbildung 5). Generell basieren solche Inhibitoren auf der hohen Elektrophilie der reaktiven Gruppe, ihre Bindung kann reversibel oder irreversibel sein. Beispielsweise sind Aldehyde, α -Keto-Carbonyl- oder α -Keto-Phosphorverbindungen reversible Inhibitoren, während die häufig verwendeten substituierten Methylketone, O-Acylhydroxylamine, Vinylsulfone und Epoxide irreversible Inhibitoren sind.

2.3.2 Endogene Inhibitoren der Cysteinproteasen

Organismen schützen sich durch Protease-Inhibitoren vor einem Selbstverdau. Die Cysteinprotease-Inhibitoren im Säugetierorganismus gehören zur Cystatinsuperfamilie und sind kleine Proteine. Basierend auf Sequenzhomologien kann die Cystatinsuperfamilie in drei Familien unterteilt werden, die Stefine, die Cystatine und die Kininogene. Alle drei Familien

zeichnen sich neben ihrer Spezifität für Cysteinproteasen durch eine große Stabilität gegenüber hohen Temperaturen und extremen pH aus. Die Kininogene sind bei pH 5-12 und bis zu einer Temperatur von 50°C stabil, die beiden anderen Familien sogar bei pH 2-12 und einer Temperatur bis 100°C. Die Hemmung der Proteasen erfolgt durch eine feste, kompetitive und reversible Bindung.^[13,117]

2.3.2.1 Die Stefin-Familie

Die Proteine der Stefin-Familie haben eine Molekülmasse von ungefähr 11 kDa und bestehen aus ca. 100 Aminosäuren. Sie zählen daher zu den LMW-Cysteinprotease-Inhibitoren (LMW, *low molecular weight*). Sie besitzen weder Disulfidbrücken noch liegen sie glykosyliert vor, was für intrazelluläre Proteine charakteristisch ist. Humane Vertreter dieser Familie sind Cystatin A und Cystatin B. Cystatin A tritt hauptsächlich in Epithelzellen auf, während Cystatin B in allen Zellen und Geweben gefunden wird. Ein weiterer Vertreter dieser Familie ist das Stefin C, welches im Thymus von Rindern gefunden wurde.^[13,117]

2.3.2.2 Die Cystatin-Familie

Die Proteine der zweiten Familie, die Cystatine, setzen sich aus 110-120 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 12-13 kDa zusammen und zählen daher ebenfalls zu den LMW-Cysteinprotease-Inhibitoren. Im Gegensatz zu den Stefinen weisen die Cystatine zwei Disulfidbrücken in der Nähe des C-Terminus auf. Sie liegen, bis auf eine Ausnahme (Cystatin C der Ratte), unglykosyliert vor.^[13,117] Vertreter dieser zweiten Familie sind die Cystatine C,^[118] D,^[119,120] E,^[121] F,^[122] M,^[123] S, SN und SA,^[120] wobei das Cystatin C, als der am weitesten verbreitete, universellste und potenteste Inhibitor der Superfamilie gilt. Cystatin C findet man fast überall im extrazellulären Raum, wobei es auch in den kortikalen Neuronen, der Bauchspeicheldrüse und der Schilddrüse gefunden wurde. Der erste Cysteinprotease-Inhibitor mit einer Proteinstruktur wurde 1968 aus dem Eiweiß des Hühnereis isoliert. Er inhibiert pflanzliche Cysteinproteasen und Cathepsine.^[124]

2.3.2.3 Die Kininogen-Familie

Die dritte Familie, die Kininogene, zählt zu den HMW-Cysteinprotease-Inhibitoren (HMW, *high molecular weight*), wobei eine hochmolekulare Form mit Molekülmassen von ca. 120 kDa und eine niedermolekulare Form mit Molekülmassen von 50-80 kDa unterschieden werden. Die Kininogene weisen im Gegensatz zu den beiden anderen Familien mehrere

Disulfidbrücken auf und liegen glykosyliert vor. Vertreter dieser Familie sind die Kininogene H und T. Bei den Kininogenen handelt es sich um zirkulierende extrazelluläre Proteine die vorwiegend im Blutplasma gefunden wurden und dabei sowohl als Monomere, als auch als Oligomere auftreten können.^[13,117,125]

2.3.3 Niedermolekulare synthetische Inhibitoren und Naturstoffe

Synthetische Inhibitoren der Cysteinproteasen vom Peptidtyp zeigen meist ähnliche Strukturelemente. Zum einen enthalten sie einen kurzen peptidischen Teil, der aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat eine Affinität zur Protease vermittelt. Zum anderen finden sich in den Molekülen meist nucleophil angreifbare bzw. substituierbare Gruppen, die leicht mit Cystein der katalytischen Triade/Diade des Enzyms reagieren können. Resultiert hieraus eine kovalente Bindung, die unter physiologischen Bedingungen stabil ist, spricht man von einer irreversiblen Inhibition, da das Enzym unter diesen Umständen dauerhaft deaktiviert ist. Im Gegensatz dazu führen leicht spaltbare kovalente Bindungen zu einer reversiblen Inhibition. Des Weiteren gibt es die Gruppe der reversiblen nichtkovalenten Inhibitoren. Ein wichtiges Prinzip zur Inhibition von Enzymen ist das des "Übergangszustandsanalogs". Bei der Hydrolyse von Peptidbindungen wird ein tetraedrischer Übergangszustand durchlaufen. Wird nun durch den Inhibitor ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom, anstelle des sp^2 -hybridisierten Amid-Carbonylkohlenstoffs des Substrates angeboten, das während der Hydrolyse kurzfristig zu sp^3 -Kohlenstoff umhybridisiert wird, so spricht man von einem "Übergangszustandsanalogon". Die tetraedrische Anordnung zeigt häufig eine hohe Bindungsaffinität zum Enzym, so dass es zu einer Hemmung kommt, die die Enzymaktivität senkt, meist jedoch reversibel ist.^[13]

2.3.3.1 Aldehyde

Moleküle mit Aldehydfunktion gehören zu den ersten verwendeten Cysteinprotease-Inhibitoren. Sie blockieren das aktive Cystein über die reversible Bildung eines Thioacetals. Bei der Untersuchung verschiedener Unterarten von Streptomyceten-Stämmen konnte eine Reihe von Aldehyden mit inhibitorischem Potential isoliert werden. Beispiele hierfür sind die aus Actinomyceten isolierten Aldehyde Leupeptin^[126,127] (**14**), Antipain^[128] (**13**), Chymostatine (**12**), Elastinal (**15**)^[13] (Abbildung 11), sowie die Staccopin^[129] und Strepin.^[130]

Ein großer Teil der Affinität dieser Moleküle rührt von der Wechselwirkung des P2-Leucin mit der bei papainähnlichen Cysteinproteasen wohldefinierten S2-Tasche her. Diese verankert die Inhibitoren in ihrem substratähnlichen Bindungsmodus.^[131] In den Positionen P1 und P2

bestimmen Wasserstoff- und Salzbrücken, in P3 Van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung an das Enzym. Das größte Manko all dieser Moleküle ist ihre geringe Selektivität. So inhibiert beispielsweise „Leupeptin“ Calpain, Cathepsin L und B^[132] ebenso wie das Proteasom.^[133] Zudem werden Aldehyde unter physiologischen Bedingungen rasch oxidiert.^[134] Die Zellgängigkeit der Substanzen wurde durch die *N*-terminale Derivatisierung mit hydrophoben Gruppen verbessert, dennoch bleibt ihr Nutzen eingeschränkt, auch wenn sie in einer Reihe von *in vitro* Studien an isolierten Proteinen und lebenden Zellen verwendet wurden.^[135-137]

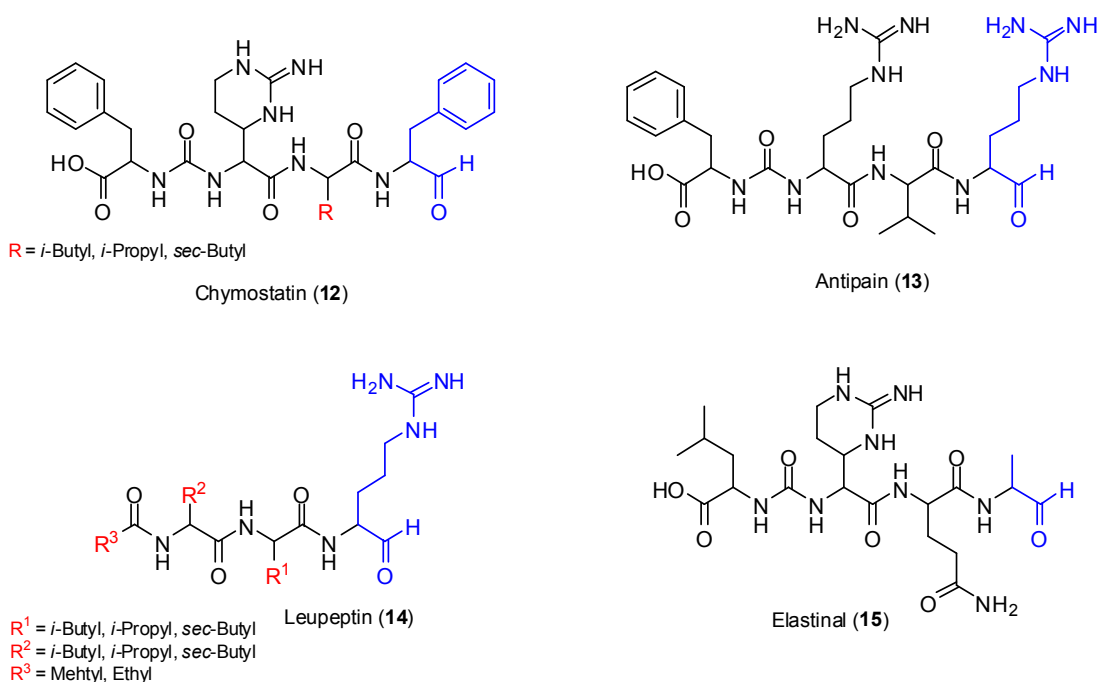


Abbildung 11: Peptidylaldehyd-Inhibitoren der papainähnlichen Cysteinproteasen. Chymostatin (12), Antipain (13), Leupeptin (14), Elastinal (15).^[118] Die Aldehydfunktion und ihre in die S1-Tasche ragende P1-Seitenkettenfunktion sind in blau dargestellt.

Die Entwicklung von Peptidylaldehyden als potente Protease-Inhibitoren basiert in erster Linie auf der Grundidee, den tetraedrischen Übergangszustand, der Hydrolyse eines Peptids durch eine Protease zu imitieren. Die hydratisierte Form des Aldehyds, die im Gleichgewicht zu ungefähr 42% vorliegt, kann auf diese Weise als Übergangszustandsanaloga fungieren.^[138,139] Im weiteren Verlauf der Analyse wurde festgestellt, dass die freie Aldehydgruppe essentiell für die Hemmung des Enzyms ist. Der Aldehyd, der im wässrigen Milieu nur zwei Prozent vorliegt, wird durch das Enzym nucleophil angegriffen und in ein Hemithioketal überführt. Diese kovalente Bindung ist unter physiologischen Bedingungen leicht spaltbar, so dass es zu einer reversiblen Inhibition kommt.^[13,140]

2.3.3.2 α -Methylketone und Vinylsulfone

Drenth und Mitarbeiter nutzten 1976 das Chlormethylketon ZPACK zur ersten Bestimmung der Kristallstruktur eines Cysteinprotease-Inhibitor-Komplexes.^[141] Auf Grundlage computer-gestützter Modelle postulierten sie tetraedrale Zwischenprodukte der Acylierung von Cysteinproteasen und die inzwischen allgemein akzeptierte Beteiligung eines Histidin- und Glutaminrests am Katalysemechanismus. Die Lage solcher Hemmstoffe wurde als substratartig bestimmt,^[142,143] mit einem hydrophoben Rest (hier Phe) in der S2-Tasche und dem Chlormethylketon in Position S1. Im Gegensatz zu Serinproteasen, bei denen die kovalente Bindung vom essentiellen Histidinrest ausgeht,^[144] bilden solche Elektrophile mit Cysteinproteasen eine Acylbindung aus. Cathers *et al.* bestimmten den pKs-Wert der pH-abhängigen konformationellen Änderung des *occluding loop* von Cathepsin B mittels eines epoxidischen Inhibitors und seines Chlormethylderivats.^[38]

Eine Reihe strukturell verwandter Fluormethylketone wurde gegen Krankheiten wie Malaria^[145] und Bilharziose^[146] entwickelt, die durch parasitäre Einzeller verursacht werden. Die Wirkstoffe blockieren spezifische Cathepsine, wie beispielsweise Cruzain.^[147] Die Toxizität von Vinylsulfonen ist im Vergleich zu den Chlor- oder Fluor-methylketonen deutlich geringer. Ihre geringere Bioverfügbarkeit bedingt ein niedrigeres Blutserumniveau, so dass der intrazelluläre Raum nicht erreicht wird. Vinylsulfon K11777 (**16**) ist gegen die Chagas-Krankheit hochwirksam,^[148] inhibiert jedoch ebenfalls humane Cathepsine wie Cathepsin V.^[149]

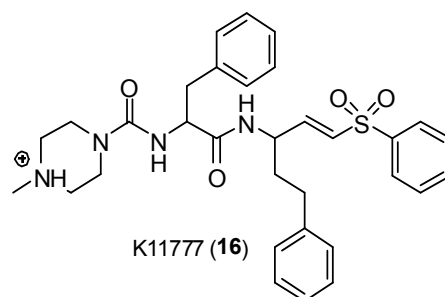


Abbildung 12: Strukturformel des Cruzain-Inhibitors K11777 (**16**) (Chagas-Krankheit).

2.3.3.3 Epoxybernsteinsäure-Derivate

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren mit Epoxybernsteinsäure als reaktiver Einheit werden im Folgenden gesondert behandelt. Im Text eingefügte Sequenzen sind in Richtung der Substratbindung (von ...P2', P1' nach P1, P2...) angegeben. Nur am Rande sei erwähnt, dass auch Inhibitoren mit anderen Epoxid-Motiven entwickelt wurden, wie das α,β -Epoxyketon E1 (**27**) (Abbildung 16), welches Aktivität gegen Cruzain besitzt. Epoxybernsteinsäure-Peptide sind die am besten untersuchte Gruppe der Cysteinprotease-Inhibitoren. Sie bilden mit dem katalytischen Thiol einen irreversiblen α -Hydroxy-Thioether (Abbildung 13) und sind aufgrund der hohen Nucleophilie der katalytischen Thiolgruppe selektive

Inhibitoren der Cysteinproteasen.^[150] Der pKs-Wert des Cystein-Thiols beträgt 8.5, der pKs-Wert des Histidin-Imidazols liegt bei 7.^[151] Daher findet in Cysteinproteasen ein Transfer des Protons von Cystein auf Histidin statt, so dass ein Thiolat mit einem pKs-Wert von etwa 4 entsteht. Der pKs des protonierten Histidins wird dadurch auf 8,5 angehoben.^[151] Im Fall der Serinproteasen findet dahingegen kein Protonentransfer zwischen Serin und Histidin statt, so dass die Nucleophilie des katalytischen Serins um ein Vielfaches geringer ist.

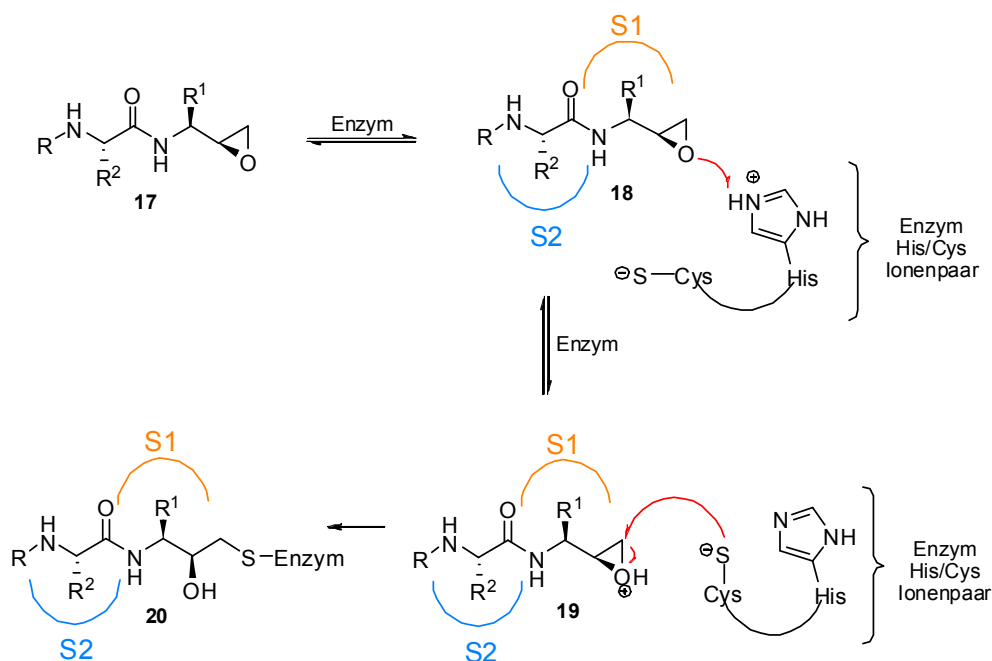


Abbildung 13: Mechanismus der Inhibition von papainähnlichen Cysteinproteasen durch Epoxysuccinyle wie z.B. E-64 (**21**) und CA074 (**33**).

Das erste Molekül dieser Familie von Inhibitoren, E-64 (**21**), wurde 1978 von Hanada aus *Aspergillus japonicus* TPR-64 isoliert^[152] und kurz darauf totalsynthetisch hergestellt.^[153] E-64-Derivate sind selektiv für papainähnliche Cysteinproteasen und weisen geringe Zelltoxizität auf, weshalb sie zu Standardwerkzeugen biologischer und biophysikalischer Studien dieser Proteine wurden, zum Beispiel zur Titration ihrer aktiven Zentren.^[96,153-157] Der hoch konservierte Bindungsmodus wurde mittels NMR^[158] und Röntgenkristallographie^[159-161] ermittelt. Das C2 Kohlenstoffatom des Oxiranrings ist an das Thiol gebunden und das Peptid besitzt einen propeptidartigen Bindungsmodus.^[160] Die Leu-Seitenkette ist in der S2-Tasche gebunden, während die freie Carboxy-Gruppe im Oxyanionen-Loch zu liegen kommt. Der hydrophobe Rest des Inhibitors liegt im Bindungsareal ab Position S3. SAR-Studien von E-64-Derivaten offenbarten die Anforderungen an eine effektive Bindung zur Protease. Für die Calpaine selbst existieren hierzu keine Daten, jedoch bestimmten Moldoveanu *et al.* die

Struktur von $\mu\text{I-II}$.^[131] Barrett und Mitarbeiter entwickelten ebenfalls eine Reihe von Inhibitoren auf Basis des Epoxybernsteinsäure-Motivs. Besonders hervorzuheben sind CA030^[162] (**32**), CA074^[163] (**33**) und CA028 (**34**) die hohe Selektivität für Cathepsin B aufweisen. Wie sich zeigte, binden sie nach einem alternativen Modus, in dem die Carboxygruppe ähnlich dem C-Terminus eines Substrats an den *occluding loop* dockt.^[164] Das Peptid kommt dabei in Richtung der Substratbindung zum liegen. Anders als üblich wird der Thioether mit dem C3 Kohlenstoffatom des Epoxids gebildet, jedoch entsteht dieser Unterschied nur durch die unterschiedliche Nomenklatur, die Lage des Epoxids im katalytischen Spalt ist tatsächlich immer gleich.

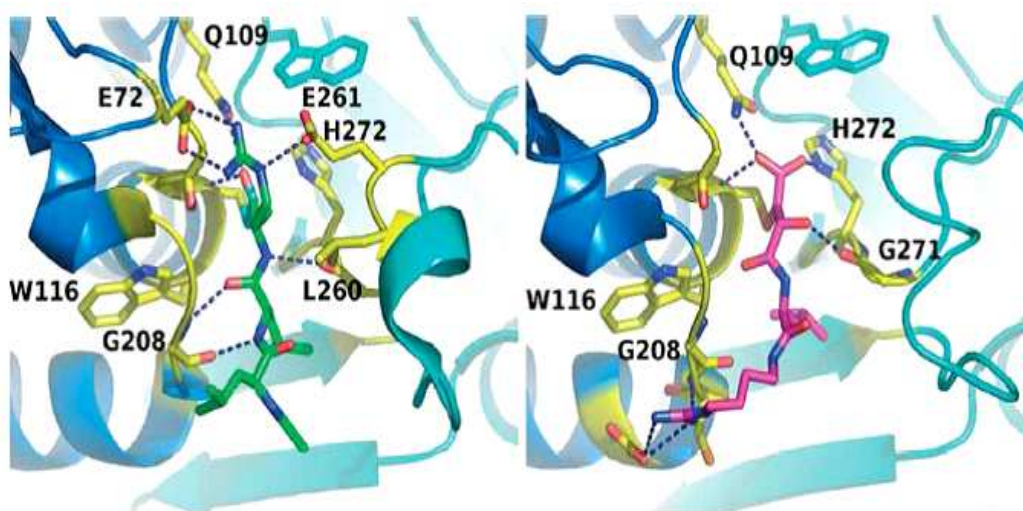


Abbildung 14: Bänderdarstellung der Röntgenstruktur des Komplexes von $\mu\text{I-II}$ mit Leupeptin (links) und E-64 (rechts).^[131] Es ist jeweils der Ausschnitt des katalytischen Spalts gezeigt. Die Inhibitoren sind jeweils im Stäbchenmodell dargestellt, die Zahlenwerte bezeichnen an der Interaktion mit dem Inhibitor beteiligte Aminosäuren der Protease.

Sowohl CA030 (**32**) als auch CA074 (**33**) sind selbst nicht membranpermeabel, im Gegensatz zu ihren Prolin-Methylestern,^[165] aus denen intrazellulär der eigentliche Hemmstoff freigesetzt wird. Katunuma und Mitarbeiter entwickelten eine Serie Epoxybernsteinsäure-basierter, Cathepsin L-selektiver Inhibitoren. CLIK-066^[166,167] (**25**) und CLIK-148^[168] (**26**) sind hervorzuheben (Abbildung 15), da beide hohe Selektivität gegenüber den Cathepsinen B, K, S, und C und gute Zellgängigkeit demonstrierten. Leider wurden nur unvollständige und unübersichtliche Daten aufgelistet und eine Angabe enzymkinetischer Daten fehlte gänzlich. Die Kristallstruktur des Komplexes von CLIK-148 (**26**) mit Papain^[168] zeigte einen E-64-artigen Bindungsmodus, in dem der Pyridinring im „gestrichenen“ Teil des katalytischen Spalts und die Seitenkette von Phe in S2 zu liegen kommt. Der Vergleich mit den Strukturdaten für Cathepsin L, B und K ergab die Argumentation, dass der raumfüllende

Pyridinring mit dem *occluding loop* von Cathepsin B unvereinbar ist.^[141,164] CLIK-079, welchem dieser Aromat fehlt, zeigte dementsprechend keinerlei Selektivität gegenüber Cathepsin B. Die Selektivität gegenüber Cathepsin K wurde mit der Größe der S2-Tasche und Unterschieden der Position 142 (Papain-Nummerierung) begründet. Während in Cathepsin K an dieser Stelle ein Glutamin zu finden ist, trägt Cathepsin L ein Leucin. Ein P1'-Lysin-Rest stabilisiert folglich die Bindung an Cathepsin K und vermindert die Selektivität der Inhibitoren. Prinzipiell erbrachten die vorgestellten *in vitro*- wie *in vivo*-Studien mit CLIK-148 (**26**) eindrucksvolle Ergebnisse, jedoch bei teilweise sehr unübersichtlicher Datenlage.^[169] So konnte der Knochenabbau durch CD34+-Tumorzellen ebenso wie durch mittels TNF- α angeregte Osteoklasten unterdrückt werden. Die Invasivität und Metastasierung verschiedener Knochenkrebs-Zelllinien konnte im Mausmodell sowohl bei intravenöser, als auch bei oraler Gabe verringert werden.

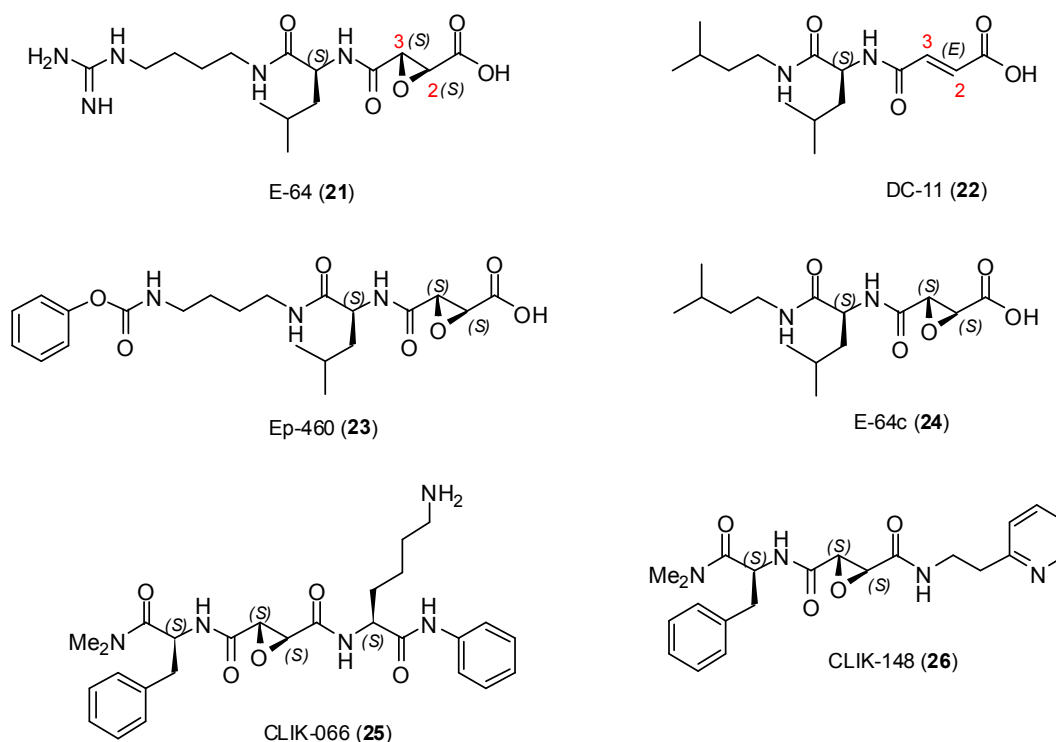


Abbildung 15: Der Naturstoff E-64 (**21**) und die synthetischen Derivate E-64c (**24**), Ep-460 (**23**) und DC-11 (**22**). Cathepsin L-selektive Inhibitoren CLIK-066 (**25**) und CLIK-148 (**26**). An E-64 sind zur Veranschaulichung des nucleophilen Angriffs durch das Thiolat die Kohlenstoffatome des Oxirans nummeriert (Angriff an C2).

Ein Austausch des Epoxids führt im Allgemeinen zu einer dramatischen Verschlechterung der Inhibition. Eine weitere Substanzklasse, für die irreversible Hemmung von Cystein-proteasen, stellen die ungesättigten Verbindungen dar. Eine aktivierte Doppelbindung

fungiert dabei als Michaelssystem, welches nucleophil angegriffen werden kann. Ein Beispiel hierfür ist der Inhibitor DC-11 (**22**), ein Analogon von E-64c (**24**), bei dem die Epoxy-succinylgruppe durch Fumarat ersetzt wurde. DC-11 (**22**) ist ein 1000-fach schwächerer Cysteinproteaseinhibitor als E64c (**24**).^[170] Dass der Mechanismus der Inhibierung über eine Michael-Addition verlaufen muss ging aus Beobachtungen hervor, in welchen der Inhibitor sowohl mit Cysteinen als auch mit Mercaptoethanol reagierte. Es wurde keine Reaktion mit den Serinproteasen oder Esterasen beobachtet.^[13] Die Herstellung und Verwendung irreversibler Inhibitoren mit Vinylsulfon-Bausteinen konnte von Palmer *et al.* gezeigt werden.^[171] Peptidylvinylsufone sind potente und selektive Inhibitoren der Cysteinproteasen. Ihre aktivierte Doppelbindung reagiert in Form einer Michael-Addition mit der Thiol-Seitenkette des Enzyms. Durch die entstehende kovalente Bindung ist die Protease irreversibel gehemmt. Aziridin-Analoga wie E2 (**28**) weisen ebenfalls stark verminderte Aktivität auf,^[172] Cyclopropan-Derivate sind inaktiv.^[173]

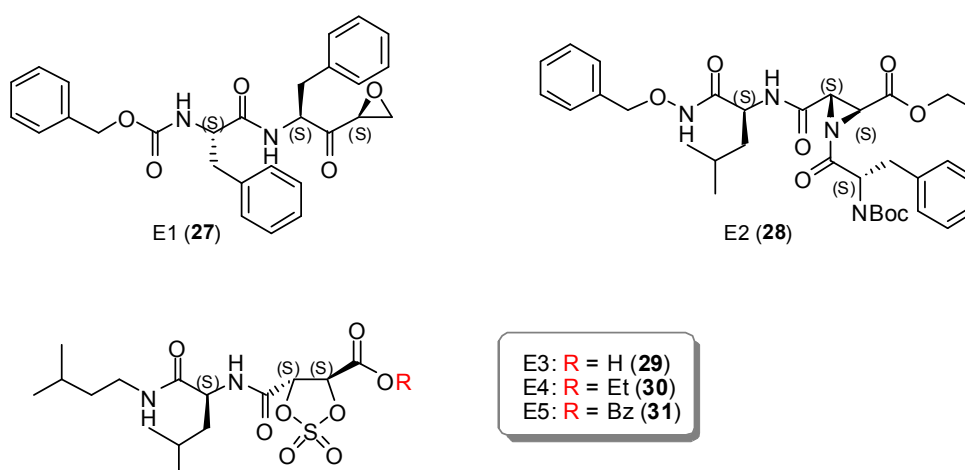


Abbildung 16: E-64-Derivate: E1 (**27**) Epoxy-Warhead, E2 (**28**) Aziridin-Warhead, E2-5 (**29**, **30**, **31**) Dioxathiolandioxid-Warhead.

Der Austausch des Oxirans durch ein Dioxathiolandioxid^[174] senkte die Affinität zu Calpain, jedoch waren die Substanzen E3-5 (**29**, **30**, **31**) exzellente Inhibitoren für Cathepsin B (Abbildung 16). Die absolute Konfiguration des Epoxids ist von entscheidender Bedeutung. Die inverse Stereoinformation des (2*R*,3*R*)-Isomers von E-64 (**21**) wies ein deutlich vermindertes inhibitorisches Potential auf.^[170] Studien mit weiteren Derivaten zeigten zunächst ebenfalls eine klare Bevorzugung der (2*S*,3*S*)-Konfiguration.^[96,175,176]

Schaschke *et al.* widerlegten jedoch die strikte Bevorzugung der (2*S*,3*S*)-Konfiguration zumindest für Cathepsin B-Inhibitoren, die mit den ungestrichenen Bindungstaschen wechselwirken.^[67] Das (2*R*,3*R*)-Derivat von CA030^[163] (**32**) wies exzellente Hemmwirkung

und Selektivität auf und übertraf die Hemmwirkung der Stammverbindung sogar um mehr als eine Zehnerpotenz. Im Gegensatz dazu zeigt das (2*R*,3*R*)-Derivat des sehr ähnlichen CA074^[163] wesentlich geringere Affinität als CA074 (**33**) selbst. Für Inhibitoren wie CA030 (**32**), welche in den gestrichenen Bereich des katalytischen Spalts von Cathepsin B binden, ist die Interaktion der Carboxygruppe mit dem *occluding loop* entscheidend, weshalb Esterderivate der Verbindungen stark verminderte Aktivität zeigen. Zusammenfassend wurde geschlossen, dass die Unterscheidung nach substrat- oder propeptid-ähnlichem Bindungsmodus, ebenso wie die Bevorzugung eines Diastereomers von minimalen Unterschieden der Inhibitorstruktur abhängt.

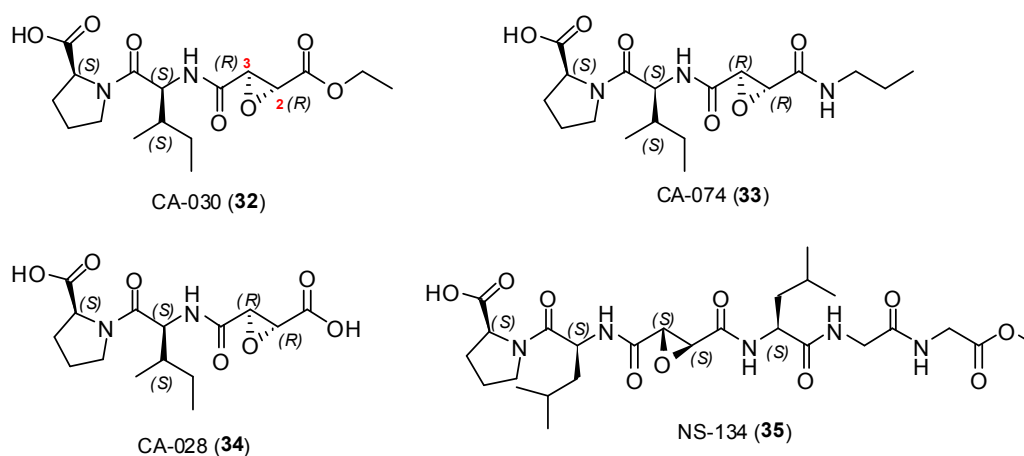


Abbildung 17: Die von A. Barrett entwickelten synthetischen Inhibitoren der CA-Reihe (**32-34**) inhibieren Cathepsin B mit hoher Selektivität.^[163,165,178] An CA-030 (**32**) sind zur Veranschaulichung des nucleophilen Angriffs durch das Thiolat die Kohlenstoffatome des Oxirans nummeriert (Angriff an C3).

Offensichtlich konkurriert die Bindung des Carboxylats an der „*occluding loop*“ mit der hydrophoben Wechselwirkung zwischen Peptid und Protease. Die Carboxygruppe von E-64 (**21**) und seinen Derivaten ist essentiell für die Interaktion des Inhibitors mit dem Oxyanionen-Loch der Cathepsine und Calpaine. So zeigt zum Beispiel E-64d, der Ethylester von E-64c (**24**), *in vitro* ein um das ca. 100- bis 1000-fache geringeres Potential, jedoch wird die Estergruppe solcher Verbindungen *in vivo* rasch durch Esterasen hydrolysiert und die ursprüngliche Verbindung wieder hergestellt.^[177] Da gleichzeitig die Zellgängigkeit verbessert wird, sind solche Moleküle ideal für zellbasierte Studien geeignet. Für andere papainähnliche Cysteinproteasen ist die Gewichtung der Interaktion zwischen der Carboxylgruppe und dem Oxyanionen-Loch weit weniger ausgeprägt. Auch substituierte Carbonylverbindungen wie Amide weisen hier gute Aktivitäten auf. Dies wird zum Beispiel durch Inhibitoren CA074^[163] (**33**) und NS-134^[178] (**35**) ersichtlich (Abbildung 17), die in dieser Position ein Amid tragen

und exzellente Inhibitoren für Cathepsin B sind. Veränderungen im ungestrichenen Teil beeinflussen das inhibitorische Potential sowie die Zellpermeabilität der Hemmstoffe. Der Austausch von Agmatin aus E-64 (**21**) gegen Isopentyl in E-64c (**24**) steigert die Affinität des Moleküls nicht (Abbildung 15), verbessert jedoch die Zellgängigkeit.^[170,179] Werden größere hydrophobe Gruppen angeknüpft, wie zum Beispiel Z-1,4-Diaminobutyl in Ep-460 (**23**), so wird die Wirksamkeit drastisch erhöht.^[179] Tatsächlich zeigte sich, dass sich die geladene Guanidinogruppe von E-64 (**21**) nicht an der Bindung mit Cathepsin B beteiligt und zum Lösungsmittel hin orientiert ist.^[163]

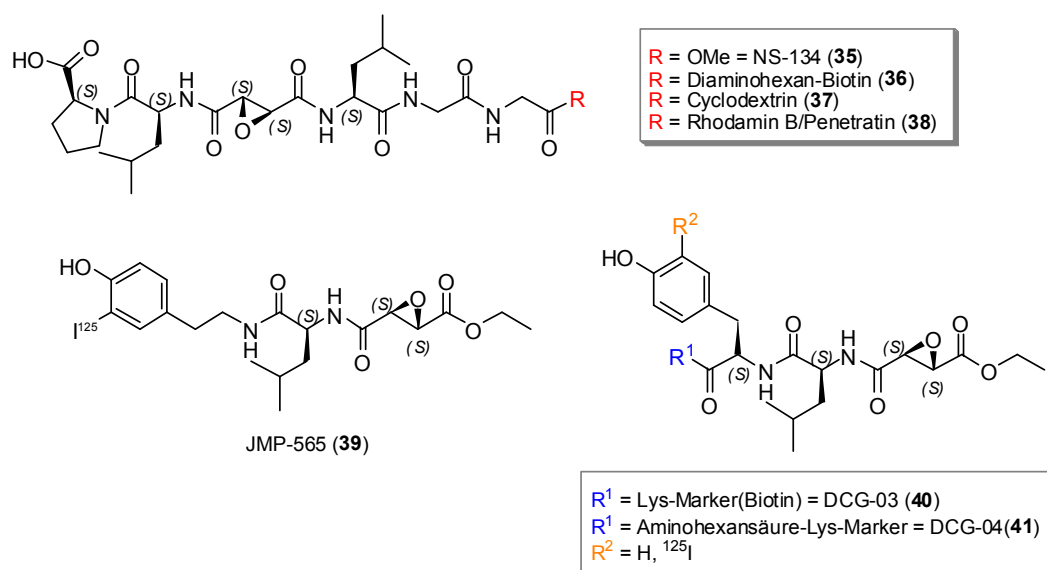


Abbildung 18: JMP-565 (**39**), DCG-03 (**40**) und DCG-04 (**41**) Reportermoleküle basierend auf der Leitstruktur des Naturstoffs E-64 (**21**). NS-134-Derivate (**36-38**) werden als Affinitäts-label eingesetzt.

Bei den bisher untersuchten Molekülen, in denen das P2-Leucin durch andere Aminosäuren ersetzt wurde, ist eine Verschiebung der Selektivität von Calpain zu den Cathepsinen zu beobachten.^[162,163,176] Ein Vergleich der Kristallstrukturdaten für Komplexe von E-64-Derivaten mit Actinidin (Kiwi-Enzym)^[160] und Papain^[159,180] mit der Lage des Propeptids in Procathepsin B^[181] zeigen eine Verschiebung der Aminosäureseitenketten um etwa eine Bindungslänge, was bereits bei der Konzeption von Inhibitoren bedacht werden muss. Leider zeigen E-64-Derivate keinerlei Selektivität innerhalb der papainähnlichen Cysteinproteasen.^[94,182-184] Ein direkter Vergleich der in der Literatur angegebenen Inhibitionskonstanten ist oft schwierig, da die meisten Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgten und k_2/K_T - oder IC_{50} -Werte angegeben sind. E-64 und seine Derivate wurden in zahlreichen *in vitro*-Untersuchungen sowohl an isolierten Proteasen, als auch in zellbasierten Experimenten als molekulare Werkzeuge verwendet um genauere Einblicke in die physio-

und pathophysiologischen Prozesse der Cysteinproteasen zu erhalten. Schaschke *et al.* adressierten sowohl die ungestrichenen, als auch gestrichenen Bindungsstellen von Cathepsin B. Ein erstes doppelköpfiges Epoxid mit Agmatin-Ornithin-Rest im ungestrichenen Teil wies entgegen den auf computerbasierten Modellen^[164] gestützten Erwartungen keine verbesserte Bindung auf. Offensichtlich ist ein einfaches Umdrehen des Substratbindungsmotivs unzureichend. Zudem sind augenscheinlich die Beiträge einzelner Aminosäuren oder auch Peptidsequenzen nicht einfach additiv; vielmehr wird oftmals eine Bindungsgeometrie erzwungen, welche die Bindung eines anderen Strukturelements stört und so die Gesamtaffinität deutlich gegenüber dem zunächst erwarteten Wert verringert. Ein optimierter Inhibitor, NS-134 (**35**) (Abbildung 17 und 18), der einen Teil des Propeptids auf der ungestrichenen Seite trägt, wies eine wesentlich stärkere Bindung zu Cathepsin B auf.^[178] Der Bindungsmodus wurde hier durch Absättigung des Glycylcarboxylats festgelegt, wie mittels Röntgenkristallographie bestätigt werden konnte.^[185] Der Inhibitor erstreckt sich von S4 bis S2', das Epoxid bindet wie E-64 (**21**) mit dem C2 Kohlenstoff. Überraschend zeigte sich jedoch, dass die Peptidkette nicht dem Verlauf des Propeptids von Cathepsin B, sondern vielmehr dem von Cathepsin L, K oder X folgt. Konjugate solcher Inhibitoren mit Rhodamin B (**38**) oder Biotin (**36**) können als Marker für die Proteomik eingesetzt werden (Abbildung 18).^[186] Die Marker sind hierbei zum Solvenz hin gerichtet, so dass das an die Protease gebundene Peptid mit einer Avidinsäule selektiv chromatographiert werden kann. Das mit Biotin markierte Peptid NS-196 (**36**) wurde in einer zellbasierten Studie zur Untersuchung der Rolle von Cathepsin B bei der Selbstzerstörung zytotoxischer T-Lymphozyten eingesetzt.^[187]

Ein Cyclodextrin-Konjugat von NS-134 (**37**) wurde als molekulares Vehikel für zytotoxische Substanzen konzipiert,^[188] um so gezielt Tumorzellen mit verstärkter Oberflächenexpression von Cathepsin B zu adressieren. Um die Zellgängigkeit zu verbessern, wurde zusätzlich *N*-terminal ein heptamer Penetratin-Peptid^[189] (**38**) angefügt. Das Inhibitionspotential dieses Konstrukts war gegenüber NS-134 *in vitro* nochmals um etwa das Vierfache gesteigert, in lebenden Zellen reichte etwa eine hundertfach geringere Konzentration im Vergleich zu NS-134 (**35**). Das von Matsumoto *et al.* vorgestellte JPM-565 (**39**) kann über Tyramin radioaktiv markiert und als Reportermolekül eingesetzt werden.^[190] Bogyo und Mitarbeiter wurden hierdurch inspiriert, eine Bibliothek radioaktiv markierter, beziehungsweise biotinylierter Reportermoleküle herzustellen. Die Epoxide DCG-03 (**40**) und DCG-04 (**41**) wurden als Sonden für Studien der zellulären Aufgaben der Cathepsine verwendet.^[191,192] Es wurde demonstriert, dass sich verschiedene Tumorzelllinien nicht nur im Expressionsmuster, sondern auch der Aktivität der einzelnen Cathepsine stark voneinander unterscheiden.^[193] Das von CA074 (**33**) abgeleitete MB-074,^[194] in dem *n*-Propyl gegen ¹²⁵I-markiertes Tyramin substituiert ist, belegte in einem ähnlichen Experiment die unterschiedliche Aktivität von

Cathepsin B in verschiedenen Tumorzelllinien und Extrakten verschiedener Gewebe aus Ratten.^[191] DCG-04 (**41**) wurde eingesetzt, um markierte Proteine mittels einer Avidin-Affinitätssäule zu isolieren. So konnten Cathepsin L, H und B mittels Sequenzierung und MS-Analyse identifiziert werden, was die Verwendbarkeit solcher Systeme für Analysen des Proteoms demonstriert. Mit einem solchen Affinitätsmarker konnte zudem die Beteiligung von m-Calpain und Calpain 3b an der Induktion des grauen Stars untersucht werden,^[195] wobei sich zeigte, dass die Aktivität von Calpain 3b aufgrund proteolytischer Prozessierung in erkranktem Gewebe bei nahezu identischer Gesamtmenge wie in gesundem Gewebe stark erhöht ist. Mit einer Bibliothek von DCG-04-Derivaten, in denen die P2-Position variierte, wurden Gewebsextrakte gesunder und entarteter Probanden behandelt und die verbleibende Proteaseaktivität mit ¹²⁵I-markiertem DCG-04 visualisiert.^[191] Die Bevorzugung aliphatischer Aminosäuren in der P2-Position bestätigte sich, andere Aminosäuren führten zu schlechterer Hemmung, erhöhten jedoch teilweise die Selektivität leicht. Für Cathepsin B wurde für die P2-Position die Präferenz Leu » Nle » Ile » Trp » Tyr » Phe gefunden. Ein ähnlicher Ansatz mit teilrandomisierten Bibliotheken vom Typ E6 (**42**) wurde für Untersuchungen der ungestrichenen Seite der Cathepsine verwendet^[196,197] und zum Patent angemeldet (Abbildung 19).^[198]

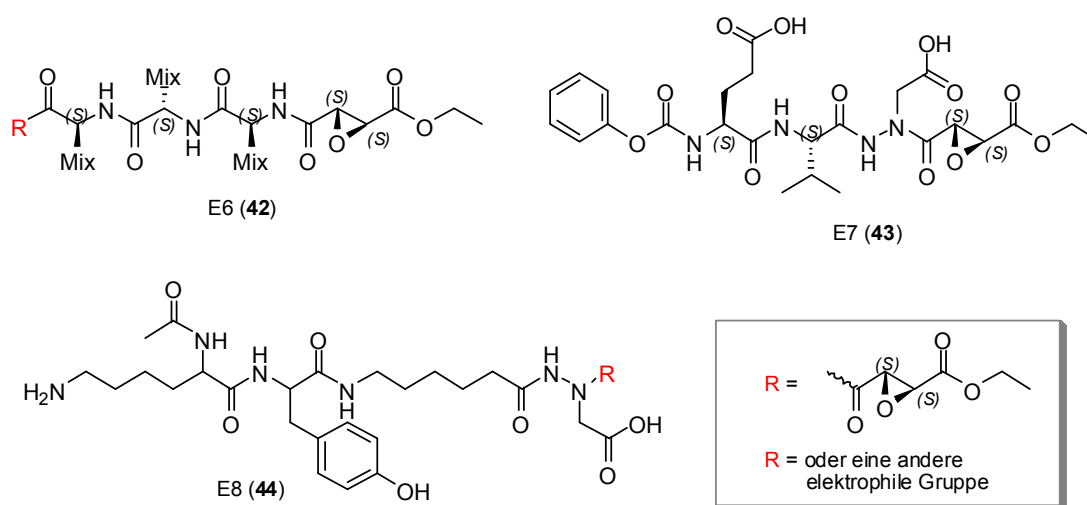


Abbildung 19: Epoxid-Bibliotheken E6-8 (**42**, **43**, **44**), P1'-substituierte Azapeptide nach Powers und Bogoy.^[200-203]

Anhand dieser Daten wurden geeignete Inhibitor-Kandidaten ermittelt^[196,197] und die Proteasen entsprechend ihres Inhibitionsprofils eingruppiert.^[197] Unbekannte Proteasen fallen durch ihre fehlende Ähnlichkeit zu anderen Proteasen auf. Ein Konzept mit doppelköpfigen Epoxybernsteinsäure-Peptiden zur Markierung von Proteasen der Papain-Familie wurde ebenfalls entwickelt.^[199] Ein generelles Manko der E-64-Analoga ist das Fehlen von P1-

Seitenketten. Die von Powers und Mitarbeitern zur Inhibierung von Caspasen entwickelten Epoxysuccinyl-Aza-peptide E7 (**43**), erlauben jedoch eine Adressierung der S1-Tasche der Cysteinproteasen.^[200-202] Die Gruppe um Bogyo stellte eine Synthese von Aza-peptiden E8 (**44**) mit Epoxid-Motiv und anderen reaktiven elektrophilen Gruppen an fester Phase vor.^[203] Solche Bibliotheken könnten zur gezielten Untersuchung der S1-Tasche verwendet werden.

Insgesamt kann resümiert werden, dass vielfältige Anwendungsmöglichkeiten für niedermolekulare Inhibitoren untersucht wurden, besonders zur Behandlung einiger schwerwiegender Krankheiten. So wurden beispielsweise Anwendungen als Immunomodulatoren,^[204] der Einsatz gegen Osteoporose,^[205-207] bei Krebsleiden^[93,101,208] oder Arteriosklerose^[76,209] geprüft. Leider sind trotz der erheblichen Anstrengungen die Ergebnisse als nur teilweise befriedigend zu bezeichnen. Für μ - oder m-Calpain konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein geeigneter Inhibitor gefunden werden. Die bisher bekannten Substanzen hemmen mindestens eine andere Protease, meist Cathepsine gleich gut oder besser als Calpain, so dass therapeutische Eingriffe in die Calpain-Aktivität immer noch außerhalb der Möglichkeiten liegen. Auf dem Gebiet der Cathepsine konnten vereinzelt Erfolgsmeldungen berichtet werden, jedoch befinden sich bisher ausschließlich zwei gegen Cathepsin K gerichtete Wirkstoffe zur Behandlung von Osteoporose in klinischen Studien.^[210] Dennoch konnten durch die Arbeiten auf diesem Gebiet tiefere Einblicke in die Funktionsweise und Regulation dieser in den Schlüsselpositionen vieler zellulärer Mechanismen sitzenden Proteasen gewonnen werden.

2.4 Mechanistische Details wichtiger Schlüsselreaktionen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Synthesen beinhalten hauptsächlich die Herstellung unterschiedlicher „Warheads“ (elektrophilen Gruppen) und die anschließende Kupplung dieser Bausteine an ein Dipeptid. Während die Darstellung der Dipeptid-Motive (Peptidsynthese) im nächsten Kapitel erläutert werden, soll in diesem Abschnitt auf die mechanistischen Details der „Warhead“-Synthese näher eingegangen werden. Das Ziel der Optimierung einer Leitstruktur hat direkten Einfluss auf die Planung der entsprechenden Versuchsreihen. Möchte man den Einfluss bestimmter struktureller Änderungen auf die biologische Wirkung mittels minimalen Aufwands überprüfen, so muss ein sorgfältiges Design der zu synthetisierenden Substanzen und der Synthesestrategie vorausgehen. Dabei entsteht das Problem, dass der Austausch eines Substituenten oder einer funktionellen Gruppe in aller Regel zu einer komplexen Änderung mehrerer Eigenschaften führt. Bei der Planung der Synthesestrategie für die Darstellung einer Substanzbibliothek ist es essentiell,

dass die gewählten Reaktionen ein großes Substratspektrum tolerieren um mit wenigen Synthesen ein möglichst breites Spektrum verschiedener physikalisch-chemischer Eigenschaften und Strukturen abzudecken.

2.4.1 Stereoselektive Diazotierung zur Darstellung enantiomerenreiner α -L-, und α -D-Hydroxysäuren

Eine präparativ wichtige S_N -Reaktion ist die enantiomerenreine Diazotierung von α -Aminosäuren. Hierbei fungiert die Carboxygruppe als Nachbargruppe. Die Carboxygruppe agiert hier in einer doppelten Funktion. Zum einen verlangsamt sie den S_N1 -artigen Zerfall des Diazoniumsalzes, welcher bei gewöhnlichen aliphatischen Diazoniumsalzen äußerst schnell verläuft (und dort zu Carbenium-Ionen mit unangenehmen reichhaltigen, da unselektiven Folgereaktionen führt).^[211] Die analoge Heterolyse einer diazotierten α -Aminosäure steht im Einklang mit dem Hammond-Postulat und läuft daher verlangsamt ab. Es müsste ein Carbenium-Ion entstehen, das durch die Carbonylgruppe als Elektronenakzeptor stark destabilisiert wird. Zum anderen greift die Carbonsäuregruppe (**46**) als Nachbargruppe aktiv in die Reaktion ein und verdrängt die Abgangsgruppe (N_2), mit dem nucleophilen, freien Elektronenpaar ihres doppelt gebundenen O-Atoms. Es entsteht ein hochgespanntes protoniertes Dreiring-Lacton (**47**, **48**), in dem die C-O₂C-Bindung durch ein externes Nucleophil von der Rückseite angegriffen wird (Abbildung 20). Das Nucleophil nimmt daher die Stellung der ursprünglichen Aminogruppe unter Retention der Konfiguration ein, oder ein Chlorid-Ion übernimmt die zweite Substitution. Diese Chemoselektivitäten erklären sich aus der von HSO_4^- über H_2O zu Cl^- oder Br^- zunehmenden Nucleophilie.

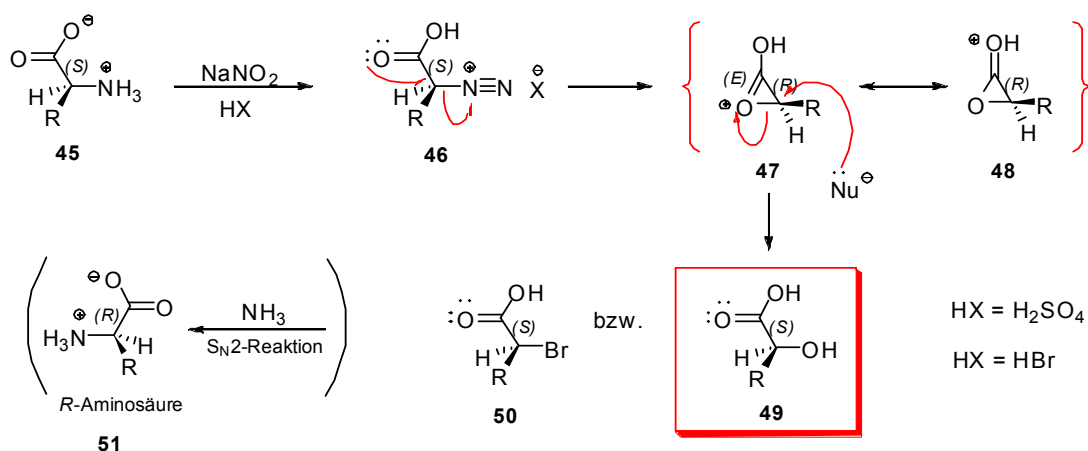


Abbildung 20: Induktion der Stereoselektivität während der Diazotierung aufgrund einer Nachbargruppenbeteiligung bei der Synthese von α -funktionalisierten Carbonsäuren.^[211]

2.4.2 Oxidation von sekundären α -Hydroxysäuren zu α -Ketosäuren

Die aus der stereoselektiven Diazotierung gewonnenen sekundären α -Hydroxysäuren müssen zur Überführung in die gewünschten Oxosäurederivate oxidiert werden. Hierfür steht eine Vielzahl unterschiedlicher Möglichkeiten zur Auswahl. Breite Anwendung für die Umsetzung sekundärer Alkohole zu den entsprechenden Oxosäuren finden Oxidationsmittel wie $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (in schwefelsaurer Lösung), RuO_4 (welches wegen der hohen Anschaffungskosten *in situ* aus katalytischen Mengen RuCl_3 und stöchiometrischen Mengen NaIO_4 gewonnen wird), CrO_3 ^[212] (in schwefelsaurer Lösung), PDC ^[213] (Pyridiniumdichromat), und TEMPO (Tetramethylpiperidin-Nitroxyl) wird katalytisch zusammen mit stöchiometrischen Mengen NaOCl eingesetzt). Nachteilig wirken sich vor allem bei den drei erstgenannten Reaktionen der Einsatz schwermetallhaltiger Reagenzien und die Intoleranz diverser Funktionalitäten bei den harschen Reaktionsbedingungen aus.

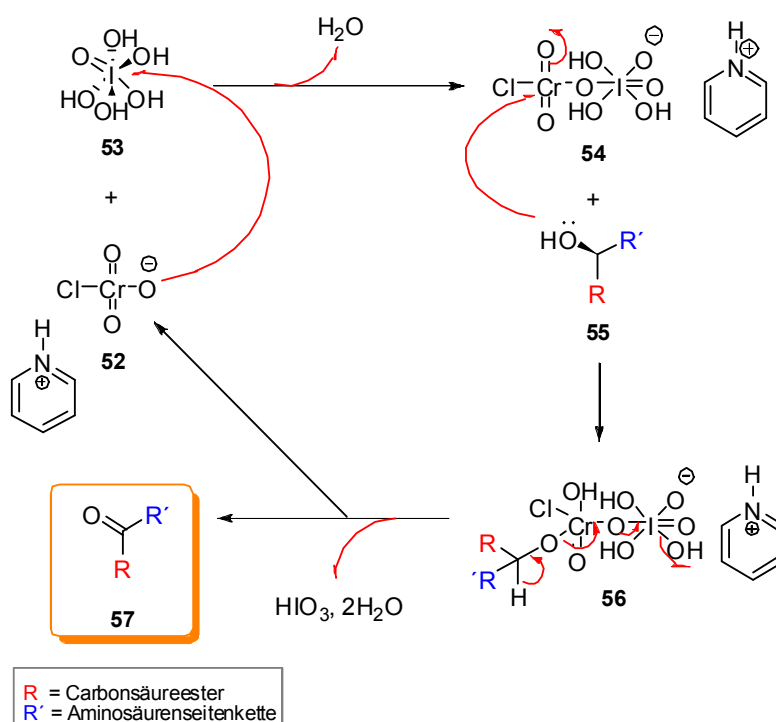


Abbildung 21: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Oxidation von sekundären Alkoholen zu Ketonen, mittels $\text{PCC}/\text{H}_5\text{IO}_6$.^[214]

Die Verwendung von TEMPO/ NaOCl -Gemischen hingegen führt bei aromatischen Substraten häufig zu chlorierten Nebenprodukten. Die Synthese funktionalisierter Oxosäuren-Derivate im Rahmen dieser Arbeit verlangte eine schonende Oxidationsprozedur, so dass, nach einem Versagen der PCC -,^[215] PDC -,^[287] TEMPO-,^[216] IBX-^[217] und Swern-

Oxidation,^[218] die Umsetzungen von *sec*-Alkoholen (**55**) mit PCC/Periodsäure^[214] (**54**) oder Dess-Martin-Periodinan^[219,220] (**58**) zum Keton (**57**) die Methoden der Wahl waren (Abbildung 21 und 22). Die Oxidation von Alkoholen zu Carbonylverbindungen mit Cr(VI) erfolgt einerseits über Chrom(VI)säure-halbester. Dieser spaltet in einer β -Eliminierung Chrom(IV)-säure ab. Dafür wird ein cyclischer Übergangszustand postuliert, wobei auch ein acyclischer Übergangszustand denkbar ist. Die auf diesem Weg freigesetzte Chrom(IV)säure kann einerseits „anorganisch“ zu Cr(III) und Cr(VI) disproportionieren, d.h. ohne Beteiligung eines organischen Moleküls in das anorganische Endprodukt Cr(III) von Cr(VI)-Oxidationen übergehen. Die Cr(IV)säure kann aber auch ihrerseits den Alkohol oxidieren und dadurch in Cr(III) übergehen.

Bei dem von Mo Hunsen postulierten Reaktionsmechanismus^[214] für die Oxidation mit PCC/H₆IO₅ geht man davon aus, dass die Periodsäure (**53**) der Regeneration des während der Oxidation verbrauchten PCC (**52**) dient. Zudem nimmt man, dass das kovalent gebundene Chlor-Atom unterstützend auf die Regeneration des katalytisch zugesetzten PCC einwirkt. Eine wichtige Annahme beinhaltet die *in situ* Generierung eines Chlorochromatperiodat-Hybrids (**54**), welches wahrscheinlich ein stärkeres Oxidationsmittel als PCC (**52**) darstellt und daher die Oxidationszahl von Cr(VI) über die ganze Reaktion bis zum Verbrauch der Periodsäure (**53**) beibehält.

Bei der Dess-Martin-Oxidation verliert das gemischte Anhydrid (**58**) zunächst über einen Dissoziations/Assoziations-Mechanismus einen der drei Acetoxyreste (**60**) unter Koordination des Alkohols (**55**). Der Aryliodid(III)säureester (**59**) erfährt eine zweistufige β -Eliminierung, bei welcher zunächst ein weiterer Acetoxyrest (**60**) abgelöst wird und eine E2-Eliminierung folgt. Neben dem Iod(I)-Derivat (**61**) wird das gewünschte Keton (**57**) erhalten.

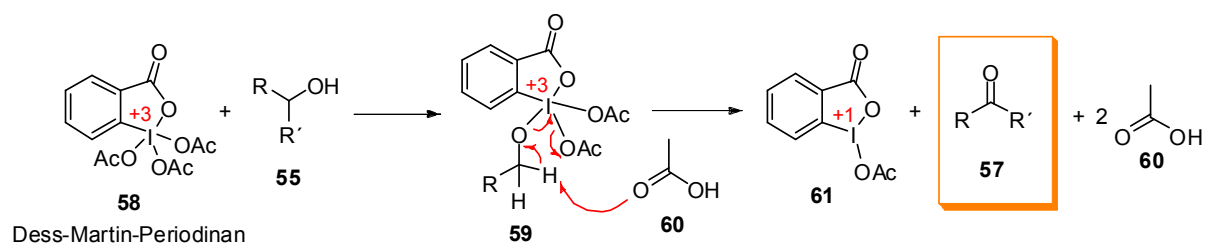


Abbildung 22: Mechanistische Details für die Oxidation von *sec*-Alkoholen (**55**) zum Keton (**60**) mit dem Dess-Martin-Periodinan (**58**).

2.4.3 Die *trans*-selektive Wittig-Reaktion zum Aufbau trisubstituierter *E*-Alkene aus α -Oxosäureestern

Der Aufbau von Doppelbindungen durch C-C-Knüpfungsreaktionen ist ein elementarer Schritt zur Synthese komplexer Molekülstrukturen, nicht zuletzt deshalb, weil aus Alkenen durch diverse Funktionalisierungen ein breites Spektrum wichtiger Substrate generiert werden kann. Neben zahlreichen Varianten der Alkensynthese sind auch Aldolkondensationen, Diels-Alder-Zyklisierungen oder die Wittig-Reaktion^[221,222] bedeutende Umsetzungen für die Erzeugung dieser Substanzklasse. Letztere ermöglicht in Form der Aza-Wittig-Reaktion auch die Darstellung der Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung.^[223] Georg Wittig etablierte um 1950 die nach ihm benannte Reaktion und wurde 1979 für seine Arbeiten auf dem Gebiet der Phosphororganyle und deren großer präparativer Bedeutung mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Auf den Mechanismus der Wittig-Reaktion soll im Folgenden kurz eingegangen werden. Durch die Deprotonierung eines Alkyltriphenylphosphoniumbromids mit starken Basen (Alkyl-Lithiumbasen) entsteht ein zwitterionisches Ylid (**63**), welches in seiner zweiten mesomeren Grenzformel als Ylen (**64**) bezeichnet wird (Abbildung 23). Die [2+2]-Cycloaddition an das Keton (**62**) führt zum heterozyklischen Oxaphosphetan, welches reversibel in seiner *cis*-(**65**) oder irreversibel in der *trans*-Form (**66**) zugänglich ist. Diese Strukturen setzen sich unter Erhalt der Konfiguration in die Alkene (**67**) bzw. (**68**) und in Triphenylphosphinoxid um. Triebkraft der Reaktion ist die Ausbildung einer stabilen Sauerstoff-Phosphor-Doppelbindung im Phosphinoxid. Empirisch wurde gefunden, dass stabilisierte Ylide (**73**) vorzugsweise *trans*-Alkene (**68**) in (thermodynamische Produkte) und labile Ylide (**74**) bevorzugt *cis*-Alkene (**67**) (kinetische Produkte) ergeben. Stabilisierte Ylide (**73**) tragen stark elektronenziehende Gruppen am carbanionischen Kohlenstoff, jedoch ist der Übergang von stabilen über semistabile bis hin zu labilen Yliden fließend und zahlreiche Ausnahmen widerlegen die theoretischen Vorhersagen.

Durch den Einsatz von *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (**73**) einem stabilisierten Ylid war es möglich die in dieser Arbeit synthetisierten Alkene fast ausschließlich in der *trans*-Form (**68**) zu erhalten. Eine andere Methode um aus labilen Yliden (**63**) selektiv das *trans*-konfigurierte Alken (**68**) zu erhalten, ist die Schlosser-Variante der Wittig-Reaktion (Abbildung 23). Hierzu werden die erhaltenen Oxaphosphetane (**65**) und (**66**) durch Zugabe von Lithiumsalzen zu den Betainen (**69**) und (**70**) geöffnet (Oxophilie des Lithiums) und am phosphortragenden Kohlenstoffatom durch Zugabe eines weiteren Äquivalents Lithiumbase zum Intermediat (**71**) deprotoniert. Nach Ansäuern mit Salzsäure entsteht stets das thermodynamisch günstige *trans*-Betain (**72**), welches nach Zusatz von

Kaliumalkoholaten ausschließlich *trans*-Oxaphosphetan (**66**) bildet und schließlich zum gewünschten *trans*-Alken (**68**) reagiert. Durch Wittig-Reaktionen mittels eines stabilen Ylids (**73**) mit substituierten α -Ketosäureestern konnten in dieser Arbeit die benötigten *trans*- bzw. (*E*)-Alkene (**68**) für die anschließende Epoxidierung oder asymmetrischen Dihydroxylierung dargestellt werden.

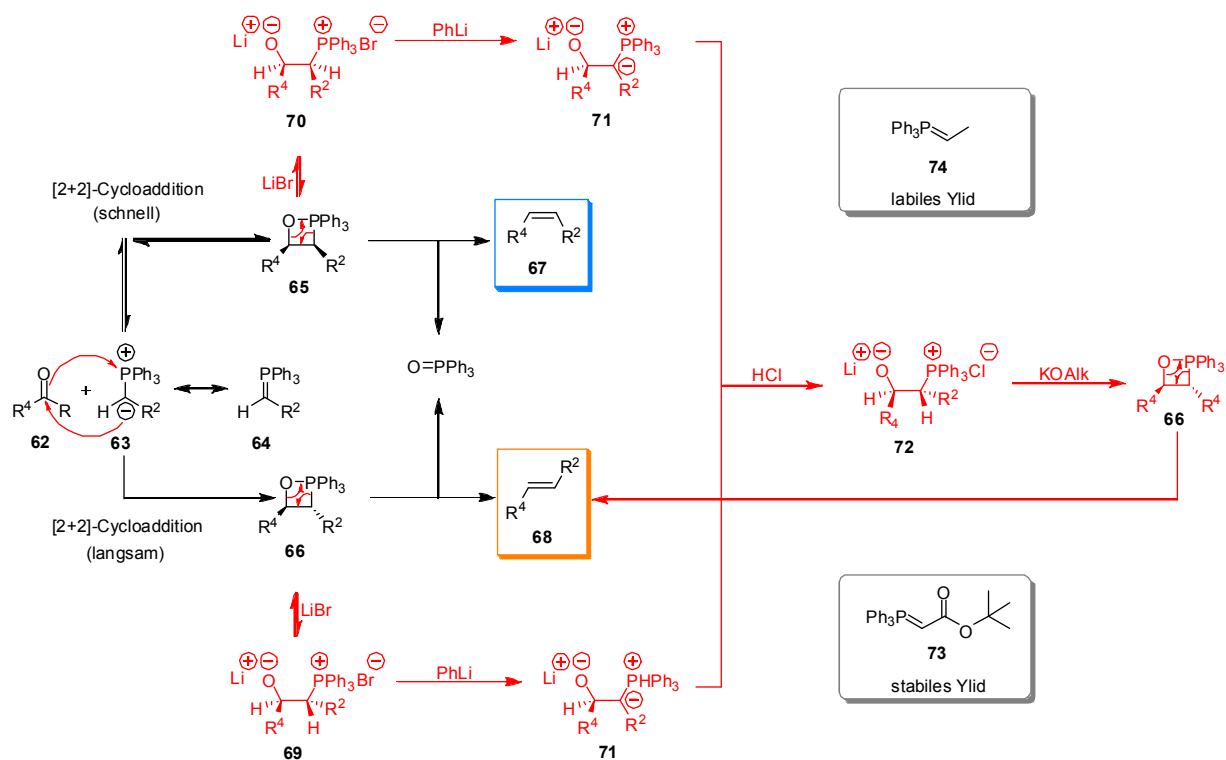


Abbildung 23: Reaktionsmechanismus der Wittig-Reaktion. Labile Ylide (**74**) reagieren kinetisch kontrolliert bevorzugt zu den *cis*-konfigurierten Alkenen (**67**), wohingegen das in dieser Arbeit verwendete stabile Ylid (**73**) thermodynamisch kontrolliert bevorzugt zu den gewünschten *trans*-Alkenen (**68**) führt.

2.4.4 Die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (Still-Gennari-Variante) zum Aufbau trisubstituierter *Z*-Alkene aus α -Oxosäureestern

Die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (HWE) ist oftmals eine methodisch wichtigere, häufiger praktizierte Ergänzung zu der o.g. Wittig-Reaktion als die Wittig-Horner-Reaktion. HWE-Reaktionen^[224,225] sind C=C-bildende Kondensationsreaktionen zwischen einem Li-, Na- oder K-Salz eines β -Keto- oder α -(Alkoxy-carbonyl)phosphonsäuredialylesters (**75**) und einem Aldehyd oder Keton (**77**).^[226-228] Dabei werden α,β -ungesättigte Ketone bzw. α,β -ungesättigte Ester (**82**) als gewünschte Verbindung gebildet sowie ein Phosphorsäure-

dialkylester (**83**) als wasserlösliches Nebenprodukt. Im Allgemeinen entstehen die gewünschten Verbindungen *trans*-selektiv bzw. im Fall von Olefinen mit trisubstituierter C=C-Doppelbindungen *E*-selektiv. Der Mechanismus der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion ist bisher noch unbewiesen.^[229] Eine Vorstellung des Reaktionsablaufs ist in Abbildung 24, anhand der Umsetzung eines metallierten Phosphonsäuredialkylesters, dessen carbanionisches Zentrum mit einer Keto-, oder Esterfunktion konjugiert ist, mit einem Aldehyd oder Keton (**77**) gezeigt. Man weiß nicht, ob das delokalisierte Carbanion (**76**) als Konformer reagiert, indem die Struktur U-förmig angeordnet und durch das Metall-Ion zu einem sechsgliedrigen Chelat verknüpft ist. Prinzipiell könnte diese Struktur auch eine Sichel- oder eine Wannen-Form einnehmen. Man ist sich auch nicht sicher, ob dieser Angriff über das Alkoholat (**78**) in zwei Stufen zum Oxaphosphetan (**79**) führt oder direkt über eine einstufige Cycloaddition erfolgt. Ebenfalls unbekannt ist, ob das Oxaphosphetan (**79**) und (**81**) in einer reversiblen oder einer irreversiblen Reaktion gebildet wird. Für eine einstufige Bildung des Oxaphosphetans (**79**) spricht die formale Analogie zur Wittig-Reaktion. Für eine zweistufige Bildung des Oxaphosphetans (**79**) spricht die vermutliche engere Analogie zur Wittig-Horner-Reaktion. Dort ist das Primärprodukt definitiv ein Alkoholat. Falls die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion analog erfolgt, würde das Carbanion (**76**) mit dem Aldehyd oder Keton (**77**) erst zum Alkoholat (**78**) reagieren, dass anschließend zum Oxaphosphetan (**79**) zyklisiert.

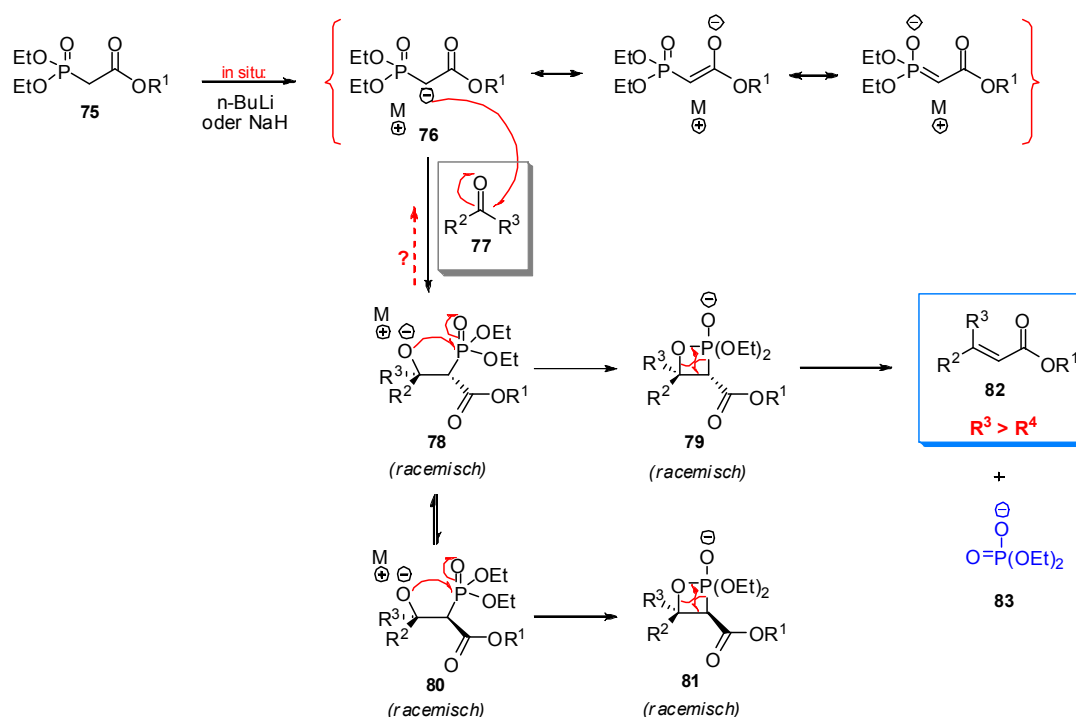


Abbildung 24: Der Reaktionsmechanismus der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion ist noch unbewiesen. Das Schema zeigt, wie man sich den Mechanismus bis jetzt vorstellt.^[229]

Der Zerfall dieses Heterocyclus ergäbe dann ein *trans*-Olefin (**82**). Warum gerade *trans*- bzw. *E*-Selektivität auftritt, ist aufgrund der geringen Kenntnis der mechanistischen Details unbekannt. Es ist möglich, dass nur das Alkoholat (**78**) zu dem gezeigten *trans*-Oxaphosphetan (**79**) zyklisiert wird. Das diastereomorphe Alkoholat (**80**) sollte vergleichsweise langsam zu dem weniger stabilen *cis*-Oxaphosphetan (**81**) zyklisieren, wenn bei dieser Zyklisierung „*product-development control*“ auftritt. Es wäre also denkbar, dass sich aus dem Carbanion (**76**) und dem Aldehyd oder Keton (**77**) zunächst unselektiv, aber reversibel sowohl das Alkoholat (**78**) als auch sein Diastereomer (**80**) bilden. Anschließend findet eine irreversible Zyklisierung des Alkoholats (**78**) zum *trans*-Oxaphosphetan (**79**) statt. Auf diesem Weg würde darauffolgend über das Gleichgewicht **80** \leftrightarrow Edukte \leftrightarrow **78** sukzessive auch das Alkoholat (**80**) in das *trans*-Oxaphosphetan (**79**) übergehen. Man hat in diesem Bild also letztlich zwischen der Bildung einer zum Olefin führenden Alkoholat-Zwischenstufe (**78**) und der Bildung einer Alkoholat-Zwischenstufe (**80**) zu unterscheiden, die nicht zu einem Olefin weiterreagieren kann. α,β -ungesättigte Ketone entstehen laut Abbildung 24 bei Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktionen also immer *trans*- bzw. *E*-selektiv.

Dies gilt im Allgemeinen auch für α,β -ungesättigte Ester. Doch bereits geringe Strukturvariationen im Phosphonester-Teil von metallierten α -(Alkoxycarbonyl)-phosphonat-Ionen kehren die Stereoselektivität der Bildung ungesättigter Ester vollkommen um (Abbildung 25a), so beispielsweise der Ersatz der (H₃C-CH₂-O)-Gruppen gegen (F₃C-CH₂-O)-Gruppen.^[230-232] Diese Strukturvariante ist das Kernstück der von mir für die *cis*-selektive Darstellung der trisubstituierten (*Z*)-Alkene angewendete Still-Gennari-Variante^[233] der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion.^[234] Diese Variante ermöglicht den selektiven Zugang zu *cis*-substituierten Acrylestern und *Z*-substituierten Methacrylestern. Die Stereostruktur der zum Produkt führenden Alkoholat-Zwischenstufe (**78**) der *trans*-selektiven HWE-Reaktion wurde bereits in Abbildung 24 festgehalten.

Die Still-Gennari-Variante dieser Reaktion (Abbildung 25b, rechts) verläuft, da ein Olefin mit entgegengesetzter Konfiguration entsteht, über ein Alkoholat mit der umgekehrten Stereostruktur. Dieses Alkoholat liegt laut Abbildung 25a als 50:50-Gemisch der Enantiomeren „C“ (**95**) und „*ent*-C“ (**96**) vor. Jedes dieser Enantiomere trägt genau zur Hälfte zur Bildung des letzten Endes erhalten *cis*-konfigurierten Acrylesters (**99**) und (**100**) bei. Analog zur Still-Gennari-Variante der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion wirkt die Ando-Variante.^[235] Bei dieser Variante setzt man ein Phosphonat ein, welches außer der zu übertragenden Alkoxy-carbonylgruppe noch zwei weitere Aryloxyreste enthalten, wie z.B. die *o*-Tolyloxyreste. Diese Art von Resten üben bei dieser Reaktion einen vergleichbaren -I-Effekt aus wie die schon erwähnten Trifluorethoxy-Gruppen der Variante von Still und Gennari und beeinflussen daher die Stereochemie in derselben Weise.

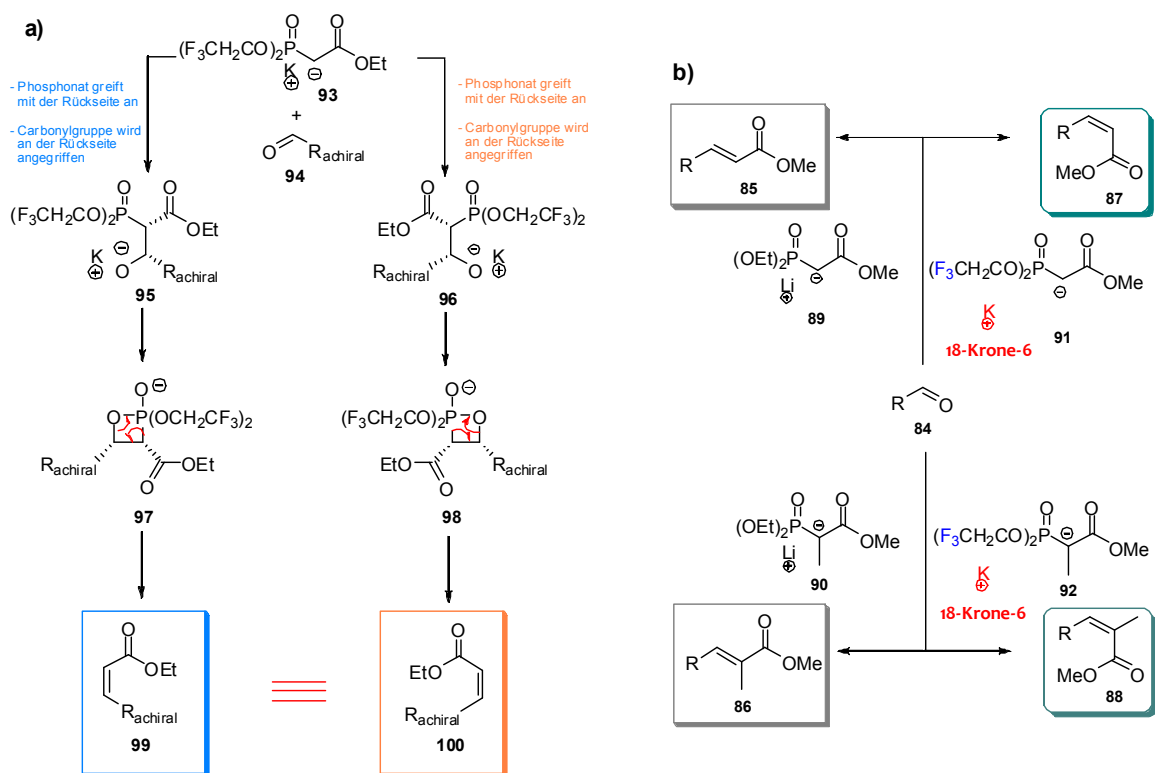


Abbildung 25: **a)** Analyse der Brutto-Stereoselektivität einer Still-Gennari-Olefinierung (aus Abbildung 24).^[233] Einfache Diastereoselektivität der Bildung der Alkoholat-Intermediate aus dem achiralen Phosphonat (**93**) und dem achiralen Aldehyd (**94**). Die Begriffe „Rückseite“ und „Vorderseite“ beziehen sich bei den Reaktanten auf die gewählte Projektion. Dieser Form wurde wegen seiner besseren Anschaulichkeit der Vorzug vor den projektions-unabhängigen Bezeichnungen *si*- und *re*-Seite (**93**) bzw. *re*- und *si*-Seite (**94**) gegeben; **b)** Gewinnung von *trans*- bzw. *E*-konfigurierten α,β -ungesättigten Estern (**85**) und (**86**) mit der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (links) oder deren *cis*- bzw. *Z*-Isomeren (**87**) und (**88**) mit der Still-Gennari-Variante davon (rechts). 18-Krone-6 ist ein sog. Kronenether und enthält einen gesättigten achtzehngliedrigen Ring. 18-Krone-6 löst die Kalium-Ionen durch Komplexbildung von dem Horner-Wadsworth-Emmons-Reagenz ab.

2.4.5 Die asymmetrische Dihydroxylierung (AD) nach Sharpless zur Darstellung enantiomerenreiner 2,3-Diol-dicarboxylate

Mit dem Chemie-Nobelpreis 2001 wurden drei Forscher für ihre Pionierleistung auf dem Gebiet der Asymmetrischen Katalyse ausgezeichnet. Einer von ihnen, B. Sharpless, wurde mit dem Preis erstens für die nach ihm benannten Epoxidierungen^[236,237] geehrt. Der zweite Grund für die Preisverleihung an ihn war die Entwicklung der asymmetrischen Dihydroxylierung (AD).^[238] Den primären Reaktionen von Sharpless ist dreierlei gemeinsam: Sie sind

Oxidationsreaktionen, sie stellen katalytische asymmetrische Synthesen dar und verdanken ihre hohe Enantiokontrolle einer Additivkontrolle der Stereoselektivität. Die besondere Bedeutung und der bis heute breite Einsatz dieser Reaktion in der organischen Synthese liegt in der Möglichkeit begründet, aus einem großen Spektrum verfügbarer Alkene, mittels einer einstufigen Umsetzung, Diole mit hohen Diastereomerüberschüssen und gewünschten Regioselektivitäten zu erhalten.

Mittels der Asymmetrischen Dihydroxylierung^[239-241] gelingt die *cis-vic*-Dihydroxylierung olefinischer C=C-Doppelbindungen hoch enantioselektiv^[242,243] für die meisten Substitutionsmuster bei großer Variationsbreite der Doppelbindungs-Substituenten R¹ bis R³ (Abbildung 26). Eine katalytisch aktive Os(VIII)- Spezies wird *in situ* aus der Os(VI)-Spezies K₂OsO₂(OH)₄ durch den Zusatz des Kooxidans K₃Fe(CN)₆ generiert. Die Reaktion wird in den meisten Fällen in einem Lösungsmittelgemisch (H₂O/Alkohol 1:1) bei Raumtemperatur oder 0°C durchgeführt. Die Enantioselektivität der asymmetrischen Dihydroxylierung resultiert aus dem Zusatz chiraler Alkaloidliganden (Abbildung 27b), welche die Stereoinformation induzieren und sich von den diastereomorphen Naturstoffen Chinin und Chinidin ableiten. Um Alkene (**101**) von ihrer α-Seite zu dihydroxylieren (**102**, Abbildung 26), setzt man 1 mol-% (DHQ)₂-PHAL als enantiomerenreines Additiv zu. Wenn Alkene (**101**) von der β-Seite (**103**) dihydroxyliert werden sollen, führt der Einsatz von 1 mol-% (DHQD)₂-PHAL als enantiomerenreines Additiv zum Erfolg. Beide Additive sind Alkaloidabkömmlinge, und beide sind enantiomerenreine Hexaamine (Abbildung 27c).

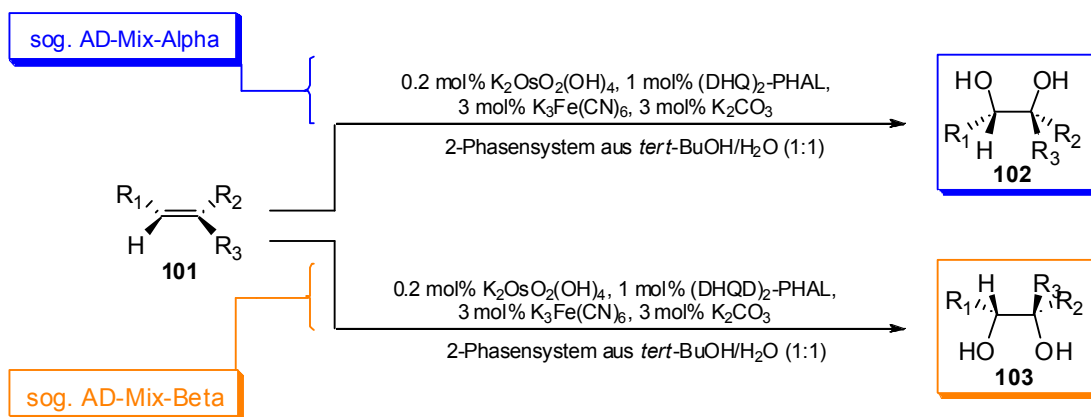


Abbildung 26: Asymmetrische *cis-vic*-Dihydroxylierung (AD) von Olefinen mit katalytischen Mengen Os(VIII), stöchiometrischen Mengen K₃Fe(CN)₆ und einem enantiomerenreinen Alkaloidliganden.

Man beachte, dass die Additive (DHQ)₂-PHAL (**109**) und (DHQD)₂-PHAL (**110**) nicht enantiomorph, sondern diastereomorph sind. Dies reflektiert die Herkunft aus zwei unterschiedlichen, diastereomorphen Naturstoffen (Chinin bzw. Chinidin). Um eine

ligandenbeschleunigte *cis-vic*-Dihydroxylierung auszulösen, benötigt jedes einzelne der Additive aber nur eines seiner sechs Stickstoffatome. Drei der „überflüssigen“ Stickstoffatome entstammen den erwähnten Naturstoffen, zwei weitere dem mittels organischer Synthese angeknüpften Phtalazin in der Molekülmitte (Abbildung 27b).

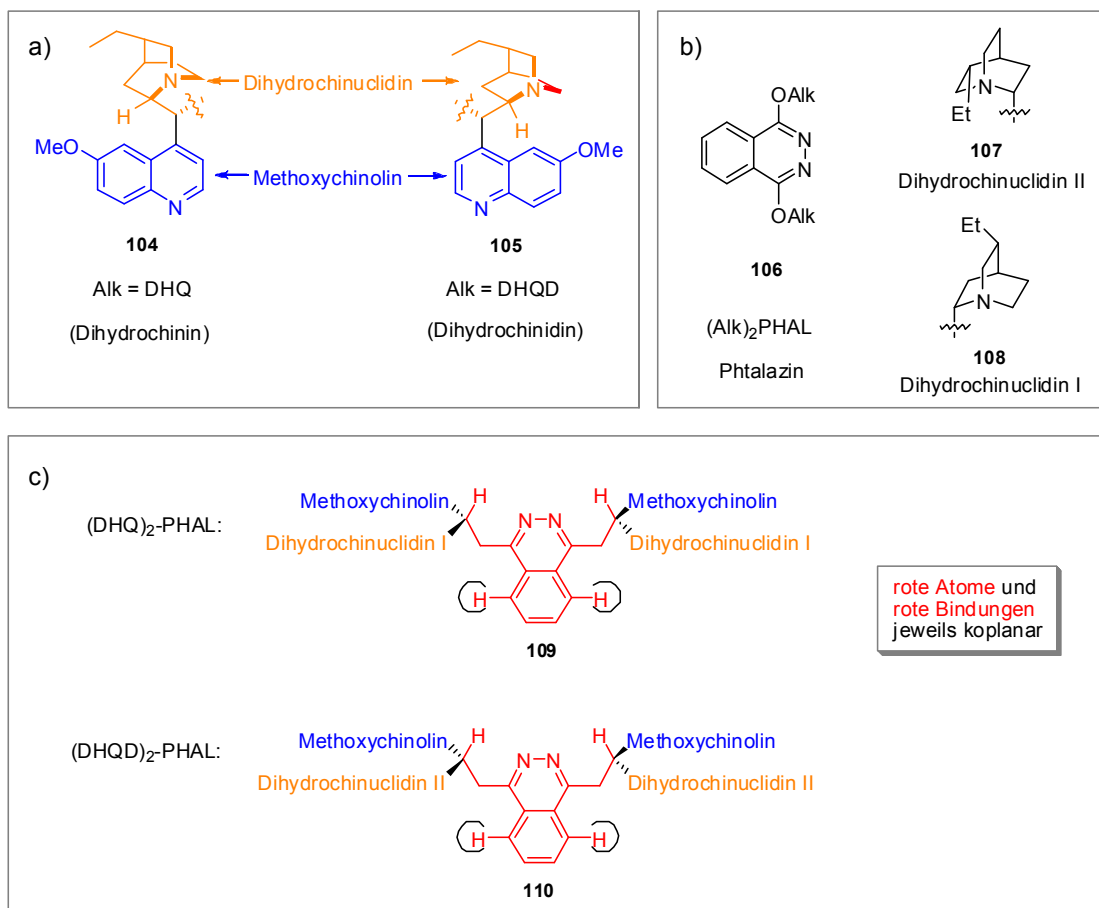


Abbildung 27: a) Grundstrukturen der bei der asymmetrischen Dihydroxylierung eingesetzten Alkaloid-Liganden (**104**, **105**), b) An der von einem Phtalazinsystem (**106**) ausgebildeten planaren Struktur sind entweder zwei Dihydrochinin (**107**)- oder zwei Dihydrochinidingerüste (**108**) gebunden, c) zeigt die peri-Wechselwirkung mit dem den gekennzeichneten H-Atomen (**109** und **110**).

Das stabilste (DHQ)₂-PHAL- (**109**) und (DHQD)₂-PHAL-Konformer (**110**, Abbildung 27c) reflektiert erstens das Streben der Sauerstoffatome am zentralen Heterocyclen nach Konjugation mit dessen π -Elektronensystem, wodurch es zu einer sp^2 -Hybridisierung der Sauerstoffatome kommt. Zweitens bringen sich die raumfüllenden *sek*-Alkylsubstituenten in eine möglichst ungehinderte Lage. Diese Umstände führen dazu, dass sie einerseits die peri-Wechselwirkung mit dem den gekennzeichneten H-Atomen (Abbildung 27c) am zentralen Heterocyclen meiden, andererseits in der Substruktur Nichtwasserstoffsusstituent-C_{sek}-O-

C=N keine U-Konformation zulassen. Eine wichtige Erkenntnis ist, dass das Vorzugskonformer von (DHQ)₂-PHAL (**109**) ebenso wie das von (DHQD)₂-PHAL (**110**) eine zweizählige Drehachse enthält, welche mit der Längsachse des zentralen Heterocyclus zusammenfällt. Diese Drehachse hat zur Folge, dass die zwei Dihydrochinuclidin-Untereinheiten jeder Verbindung durch eine Rotation um 180° aufeinander abgebildet werden können (Abbildung 27). In einer gegebenen Verbindung hat die eine Dihydrochinuclidin-Untereinheit also exakt dieselben Eigenschaften wie die andere Dihydrochinuclidin-Untereinheit. Zu der bereits genannten Ligandenbeschleunigung kommt es, wenn das Stickstoffatom einer der Dihydrochinuclidin-Untereinheiten das OsO₄ (**112**) bindet. Die Rotationssymmetrie von (DHQ)₂-PHAL (**109**) und (DHQD)₂-PHAL (**110**) besagt, dass dieselbe asymmetrische Induktion auftritt, egal ob in der Projektion (Abbildung 27) die linke oder die rechte Dihydrochinuclidin-Untereinheiten das OsO₄ (**112**) bindet. Die Ursache für die Bindung des Dihydrochinuclidin-Stickstoffatoms an das OsO₄, und nicht etwa die Bindung eines der Aromaten-Stickstoffatome liegt an der Hybridisierung, welches das freie Elektronenpaar beherbergt, das die Bindung zum Osmium aufbaut. Das freie Elektronenpaar des Dihydrochinuclidin-Stickstoffs ist sp³-hybridisiert, das freie Elektronenpaar des Aromaten-Stickstoffs sp². Eine sp³-Hybridisierung hat zu 25% s-Charakter, wohingegen ein sp² 33% s-Charakter besitzt. Ein Elektronenpaar in einem sp³-Hybridorbital ist also kernferner, mithin weniger fest gebunden und demzufolge leichter für OsO₄ verfügbar als ein Elektronenpaar in einem sp²-Hybridorbital.

Bei näherer Betrachtung des Reaktionsmechanismus (Abbildung 28) der asymmetrischen Dihydroxylierung,^[244] erfolgt zunächst die *in situ*-Generierung von Osmiumtrioxid (**112**) aus dem eingesetzten Kaliumosmatdihydrat (**111**). Umfangreiche Untersuchungen zeigten, dass OsO₄ (**112**) in einer 1-3-diplolaren Cycloaddition angreift. Daraus bildet sich ein Fünfringintermediat (**115**), ein sog. cyclischer Diester der Osmium(VI)säure der von dem anwesenden H₂O hydrolysiert wird. Hierdurch werden das *cis*-Diol (**116**) und Osmium(VI)säure (**117**) frei. *Cis-vic*-Dihydroxylierungen, bei denen die Osmium(VI)säure (**117**) ein Endprodukt darstellt, wären unbezahlbar. Ein stöchiometrischer Einsatz von OsO₄ (**112**) oder K₂OsO₄·2H₂O (**111**) ist aber nicht erforderlich. Wenn man stöchiometrisch ein Kooxidans zusetzt, sorgt dies für die Regeneration von Os(VIII) aus Os(VI), welches bei der Dihydroxylierung entsteht. Im Rahmen mechanistischer Studien wurde untersucht, wie OsO₄ (**112**) mit Alkenen (**101**) reagiert, wenn H₂O, Ligand und das Kooxidans fehlen. Dabei bilden sich die Osmium(VI)derivate (**120**) und (**118**). Daraus schloss man, dass der oben erwähnte Osmium(VI)säurediester (**115**) eine Zwischenstufe der *cis-vic*-Dihydroxylierung von Alkenen in An- und Abwesenheit von H₂O ist. In Abwesenheit von H₂O kann der Osmium(VI)ester (**115**) nicht hydrolysiert werden und reagiert daher auf einem anderen Weg weiter. Offenbar

kann er einerseits zu **120** dimerisieren. Andererseits wird er von noch vorhandenem OsO_4 (**112**) zu dem Os(VIII)-Analogen (**119**) aufoxidiert. **119** addiert sich dann an eine Doppelbindung eines weiteren Alkenmoleküls, wodurch der Tetraester (**118**) entsteht. Die letztere Umsetzung erfolgt vermutlich wie die Addition von OsO_4 (**112**) an die C=C-Doppelbindung als 1,3-dipolare Cycloaddition. In Anwesenheit von H_2O geht man davon aus, dass der Osmium(VI)diester (**115**) zum *cis*-*vic*-Diol (**116**) hydrolysiert. Es ist aber streng genommen nicht ausgeschlossen, dass die Weiterreaktion auch über die Zwischenstufe (**119**) und dort gegebenenfalls noch über (**118**) führt. Jede dieser beiden Verbindungen würde nämlich bei ihrer Hydrolyse dasselbe Diol hinterlassen wie der Osmium(VI)diester (**115**).

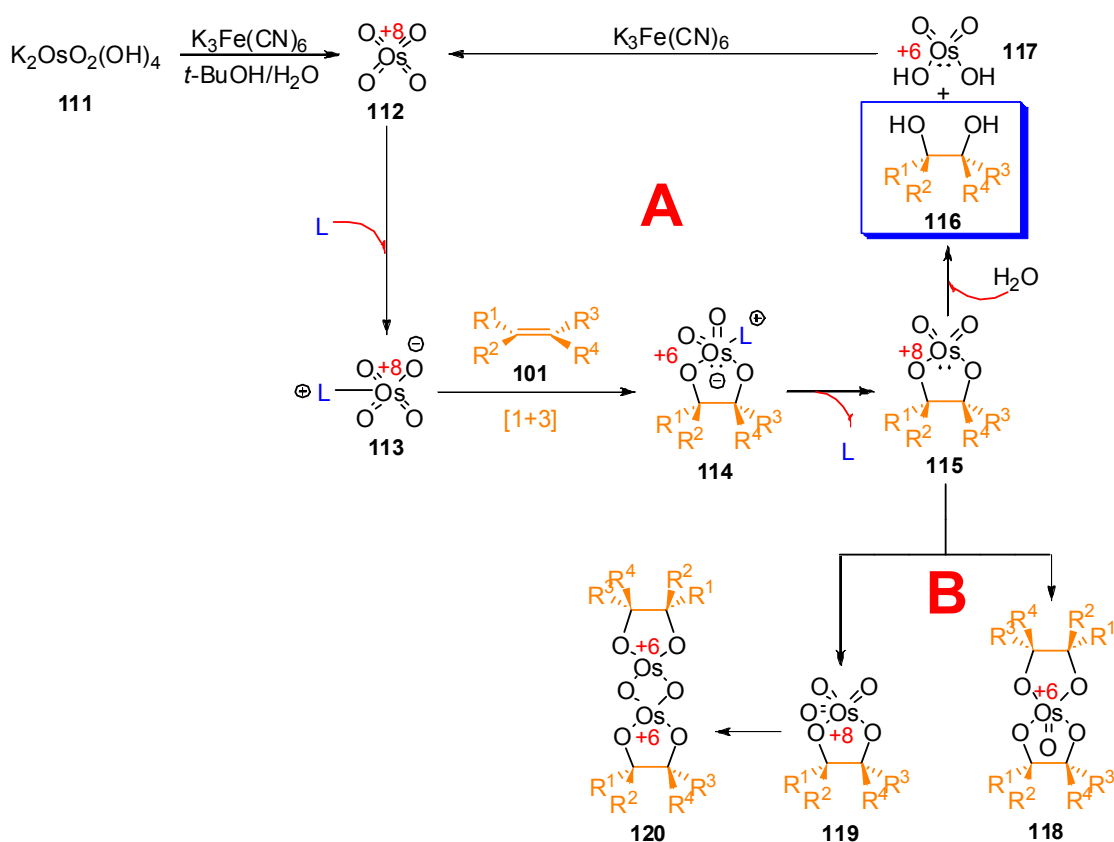


Abbildung 28: Veranschaulichung des Reaktionsmechanismus der asymmetrischen Dihydroxylierung nach Sharpless. Katalysezyklus **A** führt durch das Vorhandensein des Alkaloidliganden **L** am Zentralatom selektiv zum gewünschten Produkt (**116**), während Katalysezyklus **B** durch das Fehlen des Liganden und des Kooxidans zu racemischen Nebenprodukten ohne Induktion der Stereoinformation führt.

Beim Additionsschritt des Alkens an den aktiven Komplex (Abbildung 29) aus $(\text{DHQD})_2\text{-PHAL}$ und OsO_4 schmiegt sich das Alken zwischen das aminokomplexierte OsO_4 (**121**) auf der einen Seite und den Methoxychinolinrest auf der anderen Seite. Die Enantioselektivität

der Dihydroxylierung ist die Konsequenz davon, dass sich das Alken ganz bevorzugt in der in Abbildung 29 gezeigten Orientierung in die geschilderte Nische schmiegt. Diese Orientierung ist dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem Alken und dem „Boden“ der Nische, also dem zentralen Heterocyclus des (DHQD)₂-PHAL (**122**), keine Abstoßung auftreten darf. Das ist genau dann gewährleistet, wenn das sp²-gebundene Wasserstoffatom (als der kleinste Doppelbindungssubstituent im Substrat) in Richtung des zentralen Heterocyclus deutet.

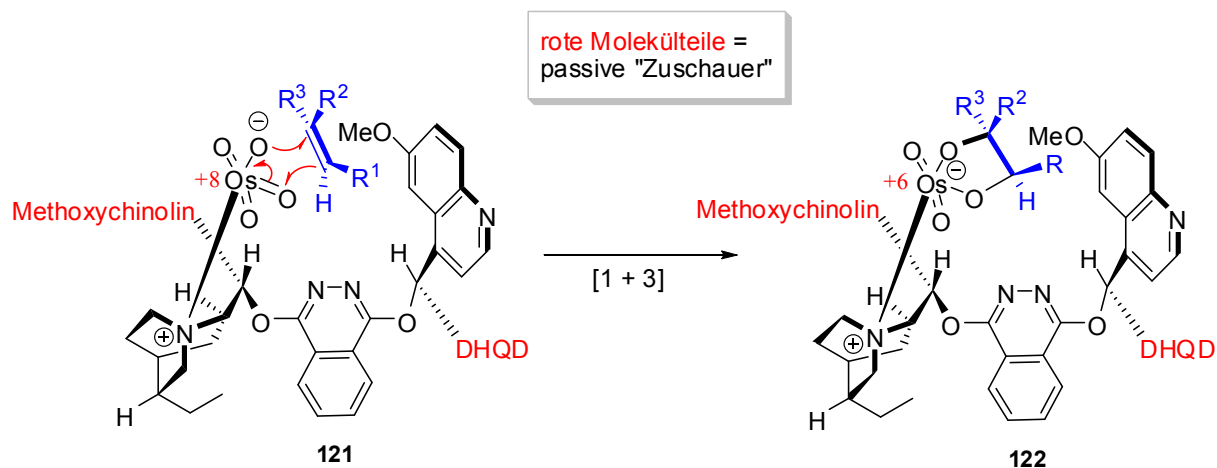


Abbildung 29: Darstellung der [1+3]-dipolaren Cycloaddition aus dem vorangegangenen Katalysezyklus (Abbildung 28). Durch den Einsatz des Ligandensystems (DHQD)₂-PHAL (**110**) wird im aktiven Osmiumkomplex (**121**) vorzugsweise nur eine Seite der olefinischen Doppelbindung angegriffen. Dies resultiert aus der unterschiedlichen Differenzierung zweier enantiotroper Angriffsflächen um die α- und β-Seite des Alkens, wobei *ein* bestimmter Ligand nur den Angriff von *einer* bestimmten Seite zulässt (DHQD: β-Angriff; DHQ: α-Angriff). In Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der Alkene lassen sich demnach Voraussagen treffen, welche Ligandensphäre die gewünschte Stereoinformation erzeugt. Die extremen Unterschiede hinsichtlich der Regioselektivität (bis hin zur völligen Umkehr) beim Wechsel der Alkaloidliganden oder der Lösungsmittelkombination lassen sich bis heute noch nicht mechanistisch erklären.

Bei näherem Betrachten der Asymmetrischen Dihydroxylierung nach Sharpless, erkennt man, dass es im Übergangszustand sowohl für *cis*- als auch für *trans*-substituierte Alkene zwei erlaubte Orientierungen gibt. Wobei das Nebeneinander dieser Orientierungen ausgehend von *cis*-Alkenen niedrige *ee*-Werte bedingt, doch bei *trans*-Alkenen zu hohen *ee*-Werten führt.

2.4.6 Epoxidierungs-Reaktion zum Aufbau trisubstituierter Epoxide ausgehend von E- bzw. Z-Alkenen

Epoxide nehmen eine zentrale Stellung in der organischen Synthese ein. Die Epoxidierung stellt in der Regel eine einstufige dreiringbildende Additionsreaktion an eine C=C-Doppelbindung dar. Meistens epoxidiert man mit Wasserstoffperoxid *meta*-Chlorperbenzoesäure (MCPBA), oder alternativ Magnesiummonoperoxyphthalat (MMPP). Als drittes Reagens setzt man Imidopersäuren für Epoxidierungen von Olefinen ein. Sie werden insbesondere immer dann eingesetzt, wenn das Substrat außer der C=C-Doppelbindung eine ketonische C=O-Doppelbindung enthält. Bei derartigen Verbindungen bewirken Percarbonsäuren nämlich vorzugsweise eine Baeyer-Villiger-Oxidation des Ketonteils, während Imidopersäuren selektiv epoxidieren. Im Übergangszustand der Epoxidierung von Olefinen (**123**) mit Percarbonsäuren ist die C=C-Achse des Olefins um genau 90° aus der Ebene der Peroxycarbonsäure-Gruppe gedreht („Spiro-Übergangszustand“), und es werden vier Elektronenpaare gleichzeitig verschoben (**125**). Diese spezielle Übergangszustandsgeometrie macht Persäure-Oxidationen von C=C-Doppelbindungen weitgehend unempfindlich gegenüber einer sterischen Hinderung (Abbildung 30). Leider sind sie für die Epoxidierung von elektronenarmen Olefinen unbrauchbar.

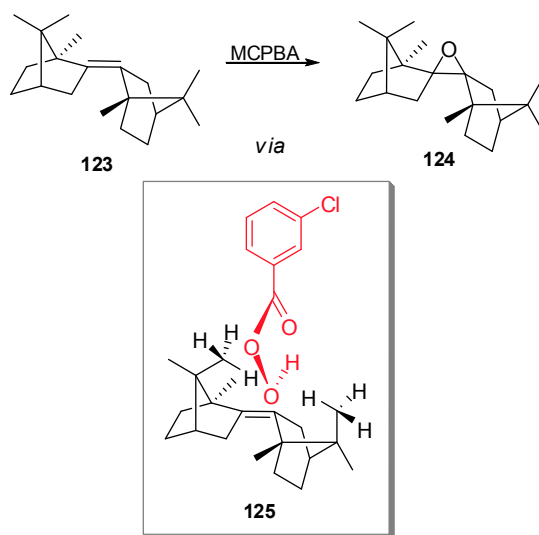


Abbildung 30: *cis*-Epoxidierung mit einer Percarbonsäure unterliegen wegen der gezeigten Übergangszustandsgeometrie kaum einer sterischen Hinderung.

Ein weiteres Beispiel für eine Epoxidierungsreaktion liefert die Asymmetrische Epoxidierung nach Sharpless. Von einer Sharpless Epoxidierung spricht man im Plural, da primäre und sekundäre Allylkohole auf unterschiedliche Weise zur Reaktion gebracht werden. Das

Oxidationsmittel der Sharpless-Epoxidierung ist stets ein Hydroperoxid, in den meisten Fällen *tert*-Butylhydroperoxid (*tert*-BuOOH). Als chirales Additiv dienen 6-12 mol% eines enantiomerenreinen Weinsäuredialkylesters, meist ein Diethylester (DET). Die Methode nach Sharpless hat Limitierungen: Erstens ist sie nur auf allylische Alkohole anwendbar und zweitens darf sich kein zu großer Rest in der 1-Position des allylischen Alkohols befinden, da es ansonsten zu sterischen Hinderung kommt welche eine Reaktion nicht mehr zulässt.^[237] Auf der anderen Seite sind die literaturbeschriebenen Möglichkeiten zur direkten Epoxidierung von elektronenarmen Doppelbindungssystemen weit entfernt von einer guten Enantio-selektivität und annehmbaren Ausbeuten. Die Methode der Wahl zur direkten Epoxidierung trisubstituierter *trans*- bzw. *E*-Alkene (**126**) stellte die von Moore beschriebene Syntheseroute in Abbildung 31 dar.^[245,246] Bei dieser Weitz-Schäffer-Epoxidierung fungiert das *in situ* gebildete Lithium-*tert*-butylhydroperoxid als Sauerstofftransferreagenz und überführt die *trans*-Alkene (**126**) in (*S,S*)- (**129**) oder (*R,R*)-Epoxysuccinate (**132**). Bei den von Moore *et al.* publizierten Ergebnissen wurde für die verwendeten α,β -ungesättigte Ester eine Stereo- und Regioselektivität nachgewiesen.

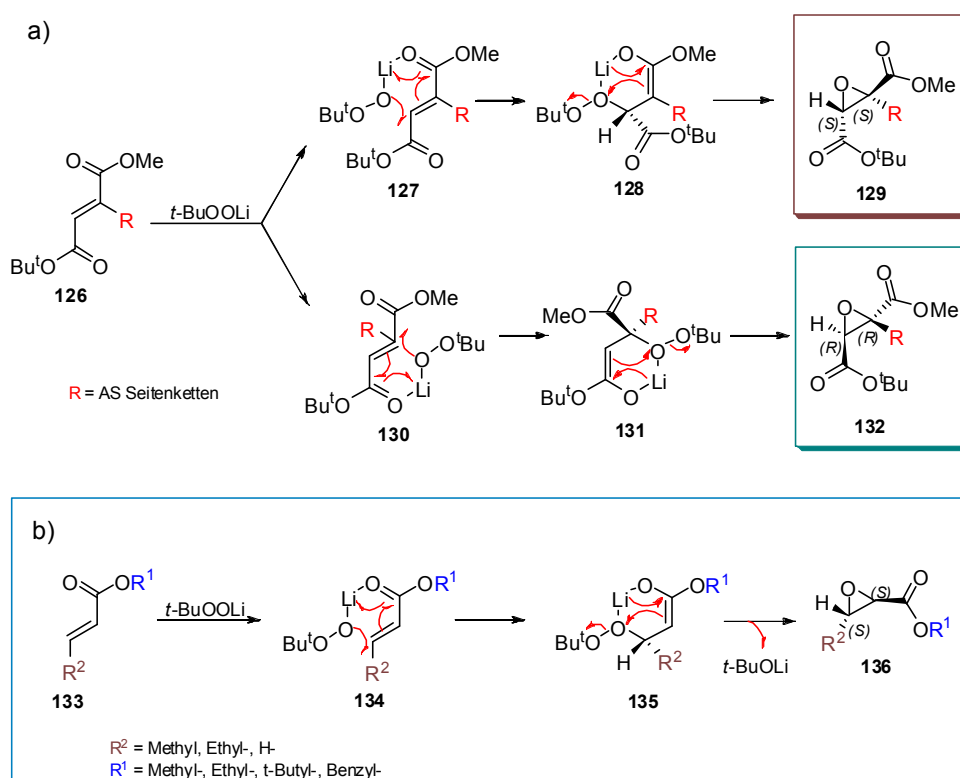


Abbildung 31: a) Zeigt den beschriebenen Reaktionsmechanismus für die in dieser Arbeit eingesetzten trisubstituierten *trans*- bzw. *E*-Alkene (**126**), welche aufgrund ihrer zwei Carbonylgruppen zu zwei möglichen Enantiomeren (**129**; **132**) führt; b) Der von Moore *et al.* publizierte Reaktionsmechanismus der α,β -ungesättigten Ester (**133**) mit nur einer Carbonylfunktion.^[245,246]

Die benötigte wasserfreie Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in Toluol ist leicht über eine azeotrope Destillation zugängliche. Das eigentliche Epoxidierungsreagenz bildet sich *in situ* durch die Zugabe eines Organolithium-Derivats (*t*-BuLi, *n*-BuLi, MeLi). Die Reaktion erfolgt in THF bei -78 °C. Die erstaunliche Stereokontrolle wird durch die Affinität des Lithiums zur Carbonylgruppe erklärt (Abbildung 31). Durch Chelatisierung der Carbonylgruppe (**127**; **130**; **134**) durch das Lithium des Epoxidierungsreagenz wird der Sauerstoff von nur einer Seite an die Doppelbindung herangeführt und über den Chelatzustand stabilisiert. Durch die Polarisierung der Sauerstoff-Lithiumbindung kommt es zum nucleophilen Angriff des Sauerstoffs auf die Doppelbindung. Aufgrund der Elektronenverschiebung in Richtung der chelatisierten Carbonylgruppe bildet sich intermediär ein sechsgliedriger Übergangszustand (**128**; **131**; **135**) aus (Induktion der Stereoinformation). Dabei wird für kurze Zeit eine kovalente Bindung zwischen Sauerstoff- und Kohlenstoff, als auch Lithium- und Sauerstoffatom gebildet, wobei die Lithium-Sauerstoffbindung des Epoxidierungsreagenz nur noch koordinativ vorhanden ist. Ein weiteres Verschieben der Elektronenpaare der Lithium-Sauerstoffbindung führt zur Dreiringbildung des Epoxids (**129**; **132**; **136**) wobei Lithium-*tert*-Butanol frei wird.

Ein Nachteil dieser Methode stellen die auftretenden Umesterungsreaktion dar welche aufgrund des eingesetzten Organolithiums unvermeidbar sind. Es kommt bei der Zugabe von Organolithium immer zu einer teilweisen Spaltung des Peroxids in Lithiumbutoxid und Alkohol welche die Umesterungsreaktion begünstigen.

2.4.7 Intramolekulare S_N2 -Reaktion zum Aufbau trisubstituierter enantiomerenreiner Epoxide aus 2,3-Diol-dicarboxylaten

In den vorhergehenden Abschnitten wurde schon die Asymmetrischen Dihydroxylierung, sowie die Asymmetrische Epoxidierung nach Sharpless erläutert. In diesem Abschnitt soll die von Sharpless etablierte stereospezifische Transformation von 1,2-Diolen in die entsprechenden Epoxide eingegangen werden.^[247] Der synthetische Zugang zu einem breiten Spektrum an 1,2-Diolen durch die asymmetrische Dihydroxylierung mit *ee*-Werten größer 90%^[248] macht die Methode nach Sharpless besonders für die enantiomerenreine Synthese von *trans*-Epoxiden interessant. Die hier beschriebene Methode stellt eine „Eintopfreaktion“ dar, welche auf der Acetoxonium-Ion^[249-252] vermittelten Formierung eines Acetatesters unter Inversion der Konfiguration des entstehenden halogensubstituierten Stereozentrums beruht (Abbildung 32). Die Verseifung der Acetoxyhalide mit darauffolgender intramolekularer nucleophiler Substitution (weitere Inversion) liefert unter Retention der Konfiguration das enantiomerenreine Epoxid.

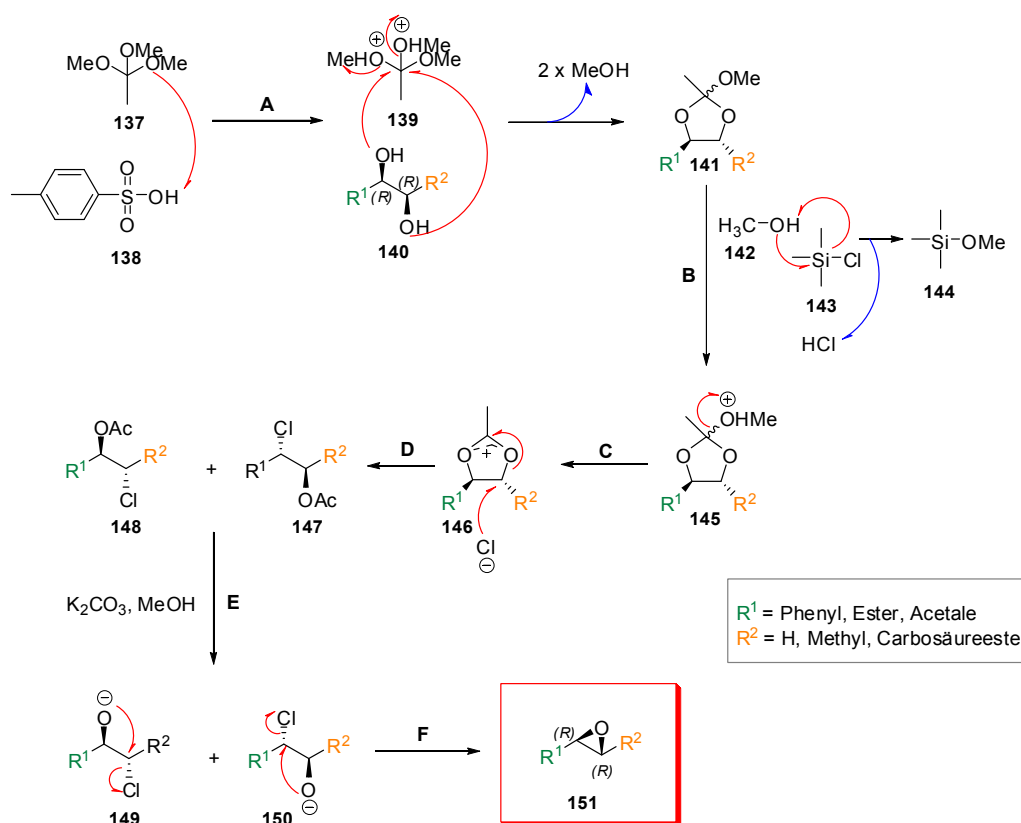


Abbildung 32: Reaktionsmechanismus der intramolekularen S_N2 -Reaktion nach Sharpless. Während der Reaktion kommt es zu einer zweimaligen Reversion am halogensubstituierten Stereozentrum unter Retention der Konfiguration. Aus diesem Grund bleibt die erste erhaltene Stereoinformation am halogensubstituierten Kohlenstoffatom ohne Konsequenzen.^[247]

Im ersten Schritt in Abbildung 32 (A) wird das 1,2-Diol (**140**) und Trimethylorthoacetat (**137**) über eine *p*-Toluolsulfonsäure (**138**) katalysierte Umesterungsreaktion zum Orthoester (**141**) umgesetzt, wobei sich eine starre Fünfringkonformation (**141**) ausbildet. Der Orthoester (**141**) wird folgend mit Trimethylsilylchlorid (**143**) (oder Acetylchlorid, Acetylbromid) in das sogenannte Acetoxyhalid (**147**; **148**) überführt. Bei diesem Reaktionsschritt erfolgt zuerst die säurekatalysierte Bildung (B und C) eines Acetoxonium-Ions (**146**), welches nucleophil von dem entstandenen Chlorid angegriffen (D) wird und es zur ersten Inversion der Konfiguration am halogensubstituierten Kohlenstoffatom der Acetoxyhalide (**147**; **148**) kommt. Im abschließenden Schritt der Reaktion wird der Acetoxyester (E) verseift, so dass das entstandene Oxyanion (**149**; **150**) über einen intramolekularen S_N2 -Mechanismus (F) den Ring zum Epoxid (**151**) schließt. Während der intramolekularen S_N2 -Reaktion (F) erfolgt die zweite Inversion der Stereoinformation am Halogensubstituierten Kohlenstoff, was über die gesamte Reaktion zu einer Retention der Konfiguration führt, und die Stereoinformation der Edukte somit erhalten bleibt.

2.5 Peptidsynthese

Die in dieser Arbeit vorgestellten Synthesen beinhalten hauptsächlich die Herstellung verschiedenster „Warheads“ (*trans*-Alkene, *trans*-Dirole, *trans*-Epoxide) und die anschließende Kupplung dieser Bausteine mit Dipeptideinheiten zu Tripeptiden. Während mechanistische Details wichtiger Schlüsselreaktionen zur Bereitstellung der Einzelbausteine („Warheads“) schon im vorhergehenden Kapitel erläutert wurden, soll in diesem Abschnitt kurz auf das allgemeine Prinzip der Knüpfung von Peptidbindungen eingegangen werden.

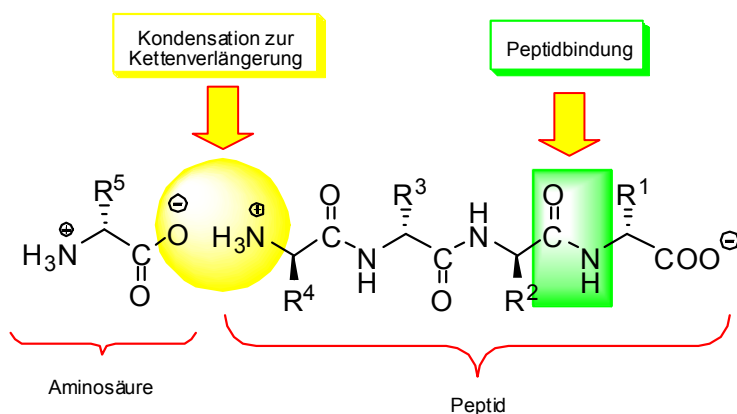


Abbildung 33: Prinzipielle Strategie zum Aufbau einer Peptidbindung unter Kondensation einer Amino- und Carboxyfunktion. Dabei wird ein resonanzstabilisiertes Carbonsäureamid (Peptidbindung) ausgebildet.

Die Synthese von Peptiden bis hin zu Proteinen beruht auf dem Prinzip der Synthese in flüssiger oder an fester Phase (Merrifield *et al.*^[253]), wobei kleinere Peptide auch heute noch gut in Lösung synthetisiert werden können. Im folgenden Abschnitt werden die Prinzipien der Peptidsynthese an fester Phase, als auch die Peptidsynthese in Lösung beschrieben. Beide Verfahrensweisen beruhen zum größten Teil auf denselben Grundlagen. Für die zielgerichtete Peptidsynthese ist es essentiell, dass vorhandene funktionelle Gruppen, die nicht zur Reaktion gebracht werden sollen, mit einer temporären Schutzgruppe maskiert sind. Dabei werden Carbonsäurefunktionalitäten in der Regel als Ester und die Aminogruppen als Carbamate geschützt.^[254] Nach erfolgreicher Kupplung wird eine Schutzgruppe entfernt, so dass der nächste Kupplungsschritt stattfinden kann. Die Peptidsynthese in Lösung kann entweder durch schrittweise Kettenverlängerung durchgeführt werden, wobei diese Strategie mit zunehmender Kettenlänge aufgrund von Löslichkeitsproblemen schwieriger wird, oder sie werden durch Kondensation kleinerer Fragmente hergestellt. Beide Strategien bieten die Möglichkeit, nach jeder Stufe einen Reinigungsschritt zu vollziehen.^[253]

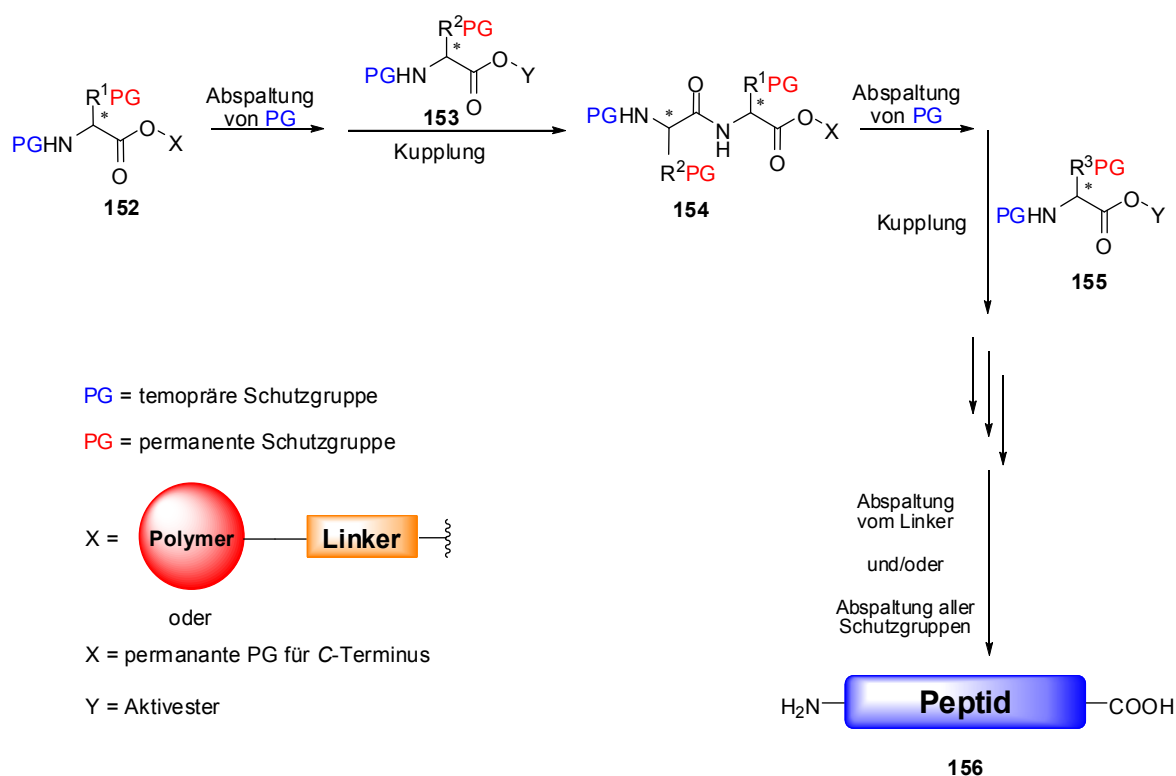


Abbildung 34: Stark vereinfachtes Schema eines schrittweisen Peptidaufbaus durch sich wiederholende Kupplungs- und Entschützungs Vorgänge. Die im Laufe einer Reaktionssequenz eingesetzten Aktivester (Y), Kupplungsreagenzien und Schutzgruppen können vielfältig sein. Essentiell ist eine orthogonale Schutzgruppenstrategie.

Der schrittweise vollsynthetische Aufbau von Peptidstrukturen an fester Phase erfolgt im Regelfall vom C- zum N-Terminus der Aminosäurenkette, im Gegensatz zum biologischen System, in dem vom N- zum C-terminalen Ende synthetisiert wird. Das Grundprinzip der gesamten Synthese sieht zunächst die C-terminale Fixierung der N-terminal geschützten ersten Aminosäure über ein Linkersystem an einem polymeren Trägermaterial (*Solid Phase Peptide Synthesis*; SPPS) oder die dauerhafte Schützung der Carboxygruppe (Synthese in Lösung) vor (**152**) (Abbildung 34). Nach einer darauf folgenden Abspaltung der *temporären* Aminoschutzgruppe erfolgt die Kupplung der zweiten N-terminal geschützten Aminosäure als Aktivester (**153**), welche ihrerseits anschließend N-terminal zum Dipeptid (**154**) entschützt und mit einer dritten Aminosäure (**155**) verknüpft wird. Die bei diesem Syntheseprotokoll möglicherweise nicht tolerierten Seitenkettenfunktionalitäten müssen mittels *permanenter* Schutzgruppen so blockiert werden, dass stets eine quasi-orthogonale Schutzgruppenstrategie gewahrt bleibt. Nach der letzten Kupplung wird im Idealfall C-terminal entschützt (bzw. vom Linker abgespalten) und gleichzeitig werden alle weiteren Peptidfunktionalitäten freigesetzt, um in einem einzigen Schritt die gewünschte Zielstruktur (**156**) zu erhalten. In

Abhängigkeit vom Syntheseproblem sind bis heute zahlreiche Protokolle etabliert worden, welche in kurzen Reaktionszeiten mit maximalen Ausbeuten zum Peptid führen. Hierbei finden hocheffiziente Kupplungs- bzw. Aktivierungsreagenzien,^[255] ein breites Spektrum selektiv abspaltbarer Schutzgruppen^[256-258] und zahlreiche organische Basen Anwendung. Hinsichtlich der sauren Abspaltung temporärer Schutzgruppen kann man grundsätzlich die Boc-Peptidsynthese (*tert*-Butyloxycarbonyl) von der Fmoc-Peptidsynthese (Fluorenylmethoxycarbonyl) unterscheiden, bei der die Aminofunktion unter basischen Bedingungen freigesetzt wird. Bei der Boc-Strategie wird die *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe (Boc) als temporäre Schutzgruppe eingesetzt (**157**), während die hydrogenolytisch abspaltbare Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Cbz) als permanente Schutzgruppe dient (**163**).

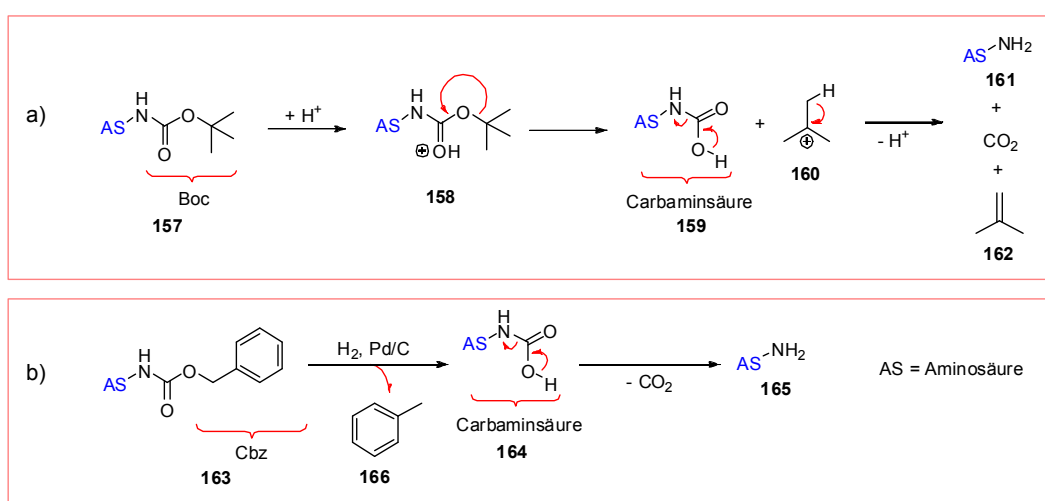


Abbildung 35: a) Abspaltung der Boc-Funktion unter sauren Bedingungen einer Aminosäure (**157**). Protoniertes Intermediat **158** reagiert zu Carbaminsäure (**159**). Das entstehende stabile *tert*-Butylkation (**160**) wird durch Scavenger wie Cresol bzw. Ethandithiol „abgefangen“ um Nebenreaktionen mit Nucleophilen zu unterbinden oder reagiert zu Isobuten (**162**). Die labile Carbaminsäure decarboxyliert spontan zum freien Amin (**161**); b) Abspaltung der Cbz-Funktion von Aminosäure (**163**) unter neutralen Bedingungen mittels einer katalytischen Hydrierung (H_2/Pd). Hierbei erfolgt die Freisetzung der Aminofunktion (**165**) unter Abspaltung von Toluol (**163**). Wobei die entstehende Carbaminsäure (**164**) zum freien Amin (**165**) decarboxyliert.

Die Boc-Gruppe ist stabil gegenüber katalytischer Hydrierung und Basen, wird aber durch sehr starke Säuren abgespalten. Bei Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) oder $\text{HCl}/1,4$ -Dioxan kommt es zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe unter Freisetzung eines *tert*-Butylkations (**160**) und der Carbaminsäure (**159**; Abbildung 35a). Das *tert*-Butylkation (**160**) stabilisiert sich nach Zerfall zu Isobuten (**162**), die Carbaminsäure (**159**) zu CO_2 und

der freien Aminogruppe (**161**) des Peptids. Zur Vermeidung von unerwünschten Nebenreaktionen muss das gebildete Carbeniumion mit nucleophilen "Scavengern" abgefangen werden. Die Einführung der Boc-Schutzgruppe erfolgt aufgrund der Instabilität von Boc-Cl nicht über Chlorameisensäure-*tert*-butylester, sondern über das stabilere Anhydrid. Die Abspaltung der Cbz-Gruppe (**163**) läuft über den Mechanismus der katalytischen Hydrierung (Abbildung 35b). Bei der Reaktion mit H₂ unter Palladiumkatalyse erfolgt die Freisetzung der Aminofunktion unter Bildung von Toluol und einer intermediären Carbaminsäure (**164**), die sich unter CO₂-Freisetzung zum *N*-terminal freien Peptid (**165**) stabilisiert (Abbildung 35b). In der Festphasensynthese wird die Cbz-Schutzgruppe nur als Seitenkettenschutzgruppe und nicht als *N*-terminale Schutzgruppe aufgrund der Notwendigkeit einer heterogen durchgeführten Hydrierung eingesetzt. In der Flüssigphasensynthese hingegen wird die *Cbz*-Strategie aufgrund der leicht zugänglichen Aufreinigung der Produkte nach der Schutzgruppenabspaltung häufig eingesetzt. Bei der Fmoc-Strategie wird die Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) als temporäre Schutzgruppe eingesetzt. Als permanente Seitenkettenschutzgruppen fungieren Substituenten vom *tert*-Butyl-Typ (Boc, *tert*-Butylester). Die Fmoc-Schutzgruppe ist säurestabil und kann leicht durch Basen abgespalten werden. Oft finden hier sekundäre Amine wie Piperidin (**168**) Verwendung, wobei unter β -Eliminierung ein Piperidin-Dibenzofulven-Addukt (**172**) gebildet wird (Abbildung 36).

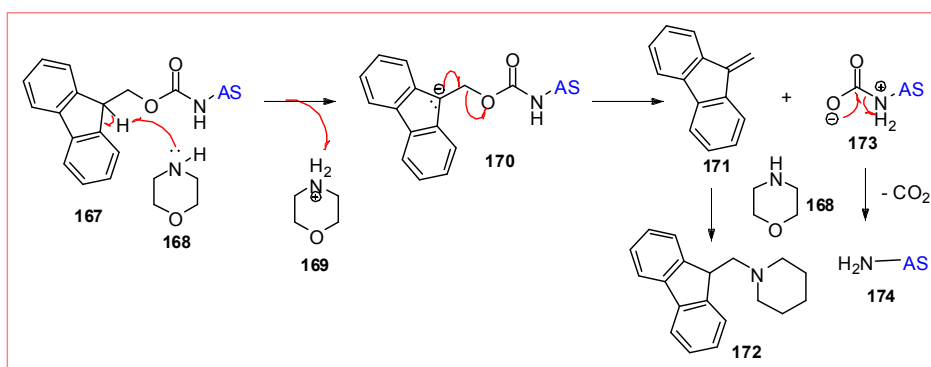


Abbildung 36: Abspaltung der Fmoc-Funktion unter basischen Bedingungen von Aminosäure (**167**).

Das bei einer Kondensationsreaktion zwischen einem Alkohol und einer Carbonsäure zum entsprechenden Ester freiwerdende Wasser kann entweder durch azeotrope Destillation oder durch den Einsatz „wasserbindender“ Zusätze (z.B. Molsieb) gebunden werden, um das Reaktionsgleichgewicht dieser Reaktion auf die Seite der Produkte zu verschieben. In der Peptidsynthese ist eine analoge Amidbindung mechanistisch nicht möglich und man bedient sich beispielsweise der Carbodiimide, die nach Addition von Wasser als Harnstoffderivate

vorliegen. Die prominentesten Vertreter dieser Familie sind Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC, **176**), Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid (EDC; wasserlöslich). Am Beispiel der ersten Verbindung ist in Abbildung 37 der Mechanismus der Carbonsäureaktivierung aufgezeigt.

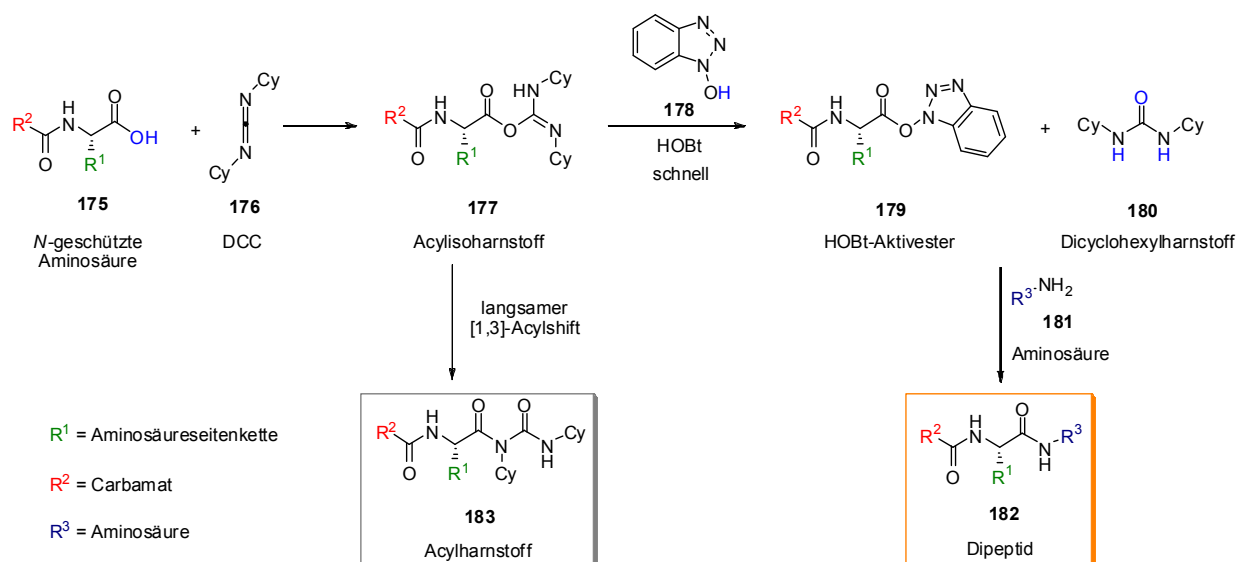


Abbildung 37: Schema einer im Verlauf der Peptidsynthese typischen Aktivierung einer Carbonsäure mit einer Kombination aus DCC (**176**) und HOBt (**178**).

Im ersten Schritt reagiert die *N*-geschützte Aminosäure (**175**) mit DCC (**176**) zu einem reaktiven Acylisoharnstoff-intermediat (**177**). Dieses wird im Regelfall mit geeigneten Nucleophilen wie beispielsweise HOBt (Hydroxybenzotriazol; **178**) zu Harnstoff (**180**) und einem Aktivester (**179**) umgesetzt, welcher in Anwesenheit der Aminosäure (**181**) zum Dipeptid (**182**) abreagiert. Prinzipiell ließe sich **177** auch direkt mit **181** zum Dipeptid umsetzen, jedoch unterliegt der Acylisoharnstoff (einer Reihe unerwünschter Nebenreaktionen, welche durch HOBt-Zusatz unterbunden werden. Neben dem gezeigten [1,3]-Acylshift zu einem unreaktiven Acylharnstoff (**183**) tritt unter basischen Bedingungen leicht Epimerisierung am C_α der aktivierten Aminosäure auf. Dieser Schritt, dargestellt in Abbildung 38, ist neben der Basenstärke des verwendeten Amins auch vom Lösungsmittel, der Temperatur und den Resten R^1 und R^2 am Acylisoharnstoff (**177**) abhängig und kann über eine Oxazolon-Zwischenstufe (**188**) verlaufen. Starker Elektronenzug (von R^1 und R^2) und eine gute Stabilisierung der negativen Ladung des entstehenden Enolats (**190**) begünstigen die unerwünschte Nebenreaktion. Durch den vorteilhaften Einsatz von Carbamaten wird im Vergleich zu *N*-Acyl- bzw. *N*-Alkylschutzgruppen die *N*-H-Acidität herabgesetzt und eine Oxazolonbildung vermindert. Durch die Verwendung sterisch

anspruchsvoller nicht-nucleophiler Basen versucht man, Deprotonierungen von Aminosäuren am C $_{\alpha}$ -Atom vorzubeugen (Abbildung 39).

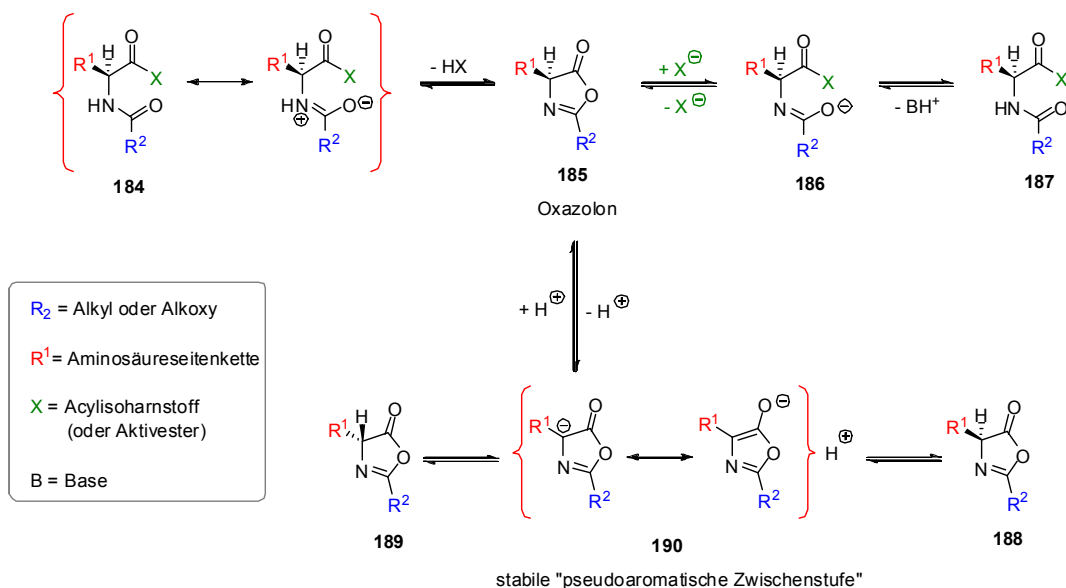


Abbildung 38: Baseninduzierte Epimerisierung von Acylisoharnstoffen (**184**) (oder C-terminal aktivierten Aminosäuren) am C $_{\alpha}$ -Atom können zunächst über die deprotonierte Struktur (**186**), Oxazolone (**188**) und die pseudoaromatische stabile Zwischenstufe (**190**) verlaufen. Da letztere ein sp²-hybridisiertes C $_{\alpha}$ -Atom besitzt, tritt bei Reprotonierung zu (**188**) bzw. (**189**) Epimerisierung ein.

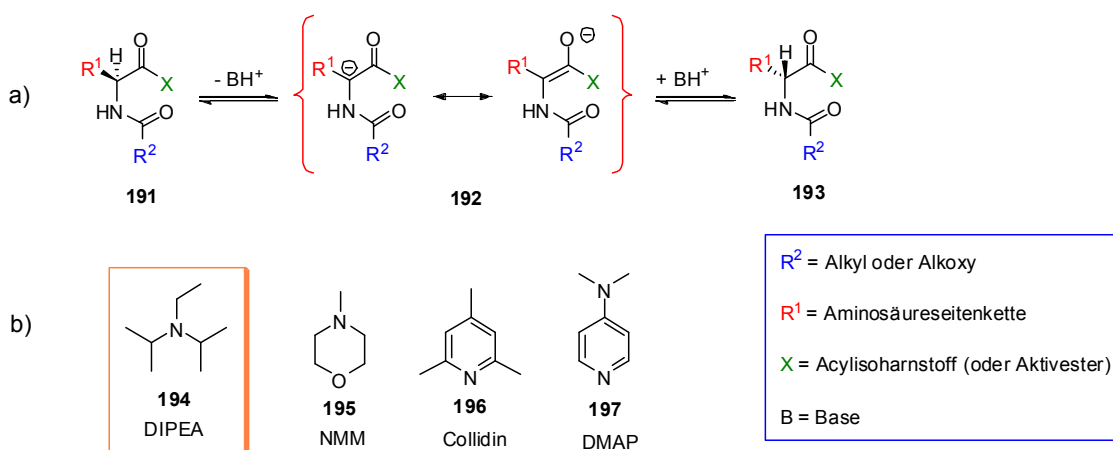


Abbildung 39: a) Baseninduzierte Epimerisierung von aktivierten Aminosäuren (**191**) verlaufen über das Enolat **192** unter Ausbildung der enantiomeren Verbindung **193**; b) Häufig in der Peptidsynthese eingesetzte nicht-nucleophile Basen: Diisopropylethylamin (Hünigs-Base; **194**), *N*-Methylmorpholin (**195**), Collidin (**196**) und Dimethylaminopyridin (**197**).

In den vergangenen Jahren wurden Kupplungsprotokolle für den Aufbau von Peptiden fortlaufend optimiert. Vor allem im Bereich effizienter, epimerisierungsunterdrückender, nichttoxischer Kupplungsreagenzien wurden beachtliche Fortschritte erzielt und das Spektrum verfügbarer Reagenzien reicht von Phosphonium-, Uronium-, Immonium-, Imidazol- bis hin zu Organophosphorreagenzien. Zusätzlich spielt die Aktivierung von Carbonsäuren in Form ihrer Säurehalogenide (mittels Thionylchlorid, Oxalylchlorid, Triphosgen, Cyanurfluorid, TFFH [Tetramethylfluorformamidinium Hexafluorophosphat] etc.) eine wichtige Rolle. Bedeutsam ist ferner die Umsetzung von (gemischten) Säureanhydriden oder Aktivestern (z.B. Pfp [Pentafluorophenol], OSu [*N*-Hydroxysuccinimid] etc.). Das Verknüpfen vollkommen ungeschützter größerer Peptidfragmente gelingt mittels der *Native Chemical Ligation* (NCL),^[259] bei der Bausteine mit einer C-terminalen Thioesterfunktion mit Fragmenten umgesetzt werden, die *N*-terminal die Aminosäure Cystein tragen.

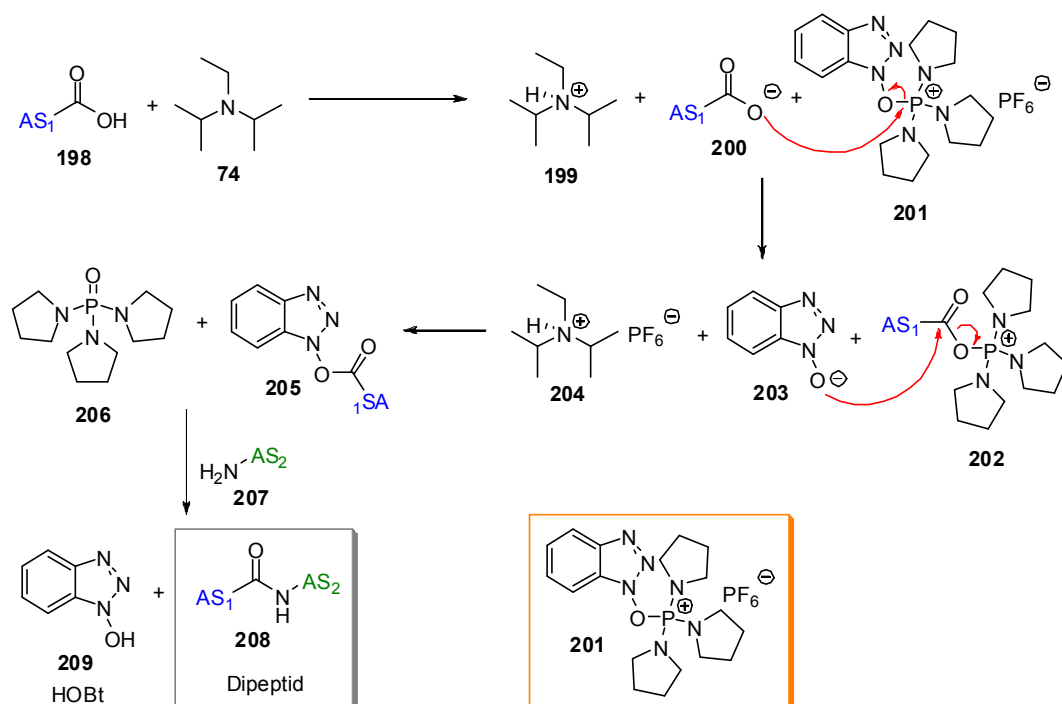


Abbildung 40: PyBOP-vermittelte Kupplung von Aminosäuren (AS) und Bildung des stabilen Phosphanoxids (**206**) als Nebenprodukt. Über das reaktive Intermediat (**202**) bildet sich ein HOBt-Aktivester (**205**). Struktur des Kupplungsreagenzes PyBOP (**201**).

Die erschwerte Kupplung *N*-alkylierter Aminosäuren an zum Teil stark epimerisierungsgefährdete Aktivester hat vor allem ab den siebziger Jahren die Entwicklung von Phosphoniumreagenzien vorangetrieben. Anhand von PyBOP ((Benzo-triazol-1-yl-oxy-*tris*-(dimethylamino)-phosphonium Hexafluorophosphat) **201** (Abbildung 40) wird deutlich, dass die Triebkraft solcher Reaktionen auf der Ausbildung einer stabilen Phosphor-Sauerstoff-

Doppelbindung zu Phosphanoxid (**206**) beruht und dass bei der Kondensationsreaktion freiwerdendes Wasser formal in drei Verbindungen, nämlich in **206**, HOBt (**209**) und dem Ammoniumsalz (**204**) gebunden wird (Abbildung 40). Der Grund für den Einsatz des Hexafluorosphat-Anions (wahlweise auch Tetrafluoroborat-Anion) als Gegenion liegt in dessen extrem geringer Nucleophilie. Coste *et al.*^[260,261] beschrieben erstmals, dass bei der Umsetzung *N*-methylierter Aminosäuren unter Einsatz halogenierter Phosphoniumreagenzien wie PyBOP ((Benzo-triazol-1-yl-oxy-*tris*-(dimethylamino)-phosphonium Hexafluorosphat) **201** signifikante Steigerungen hinsichtlich der Reaktionsausbeuten erzielt worden.

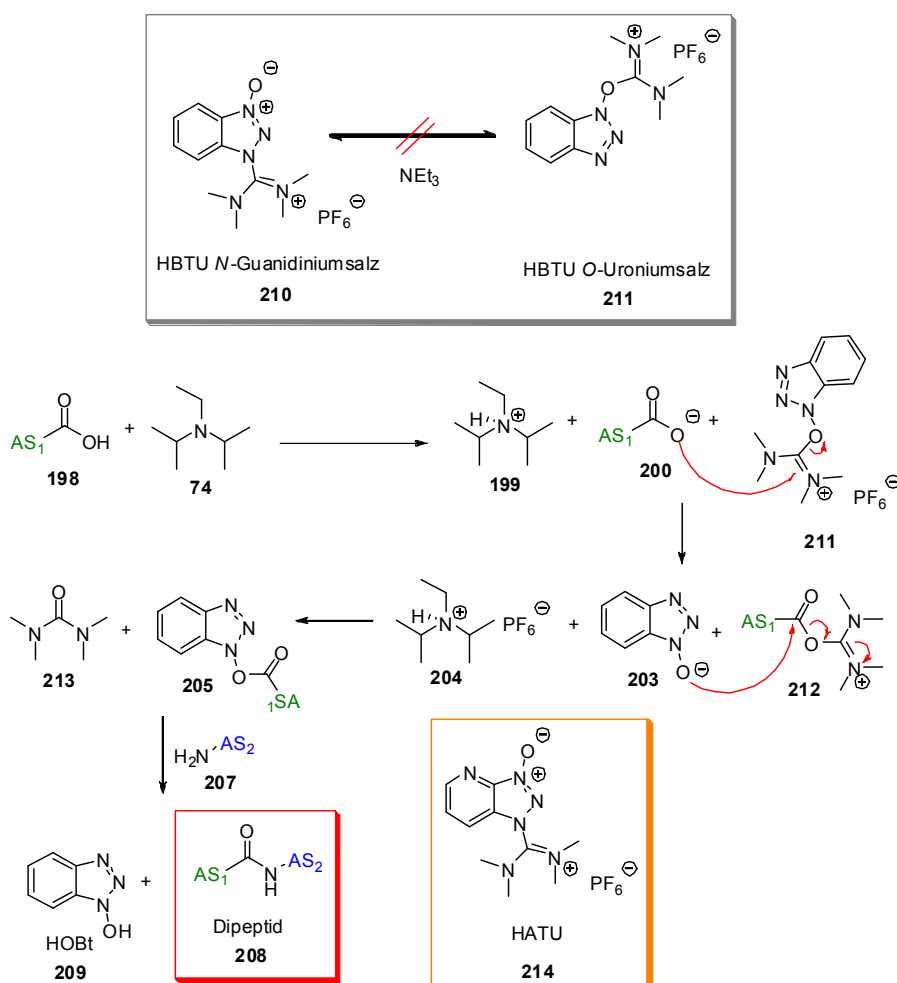


Abbildung 41: Mechanismus der Carbonsäureaktivierung und Aminosäurekupplung mit HBTU.

Das 1978 von Gross *et al.*^[262,263] eingeführte Uroniumreagenz HBTU (O-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium Hexafluorophosphat) kann entweder in Form des unreaktiven *N*-Guanidiniumsalzes (**210**) oder in der reaktiven *O*-Uroniumsalzstruktur (**211**) vorliegen^[264]

und wurde im Laufe der Jahre strukturell so modifiziert, dass mittlerweile über ein Dutzend weiterer Vertreter dieser Substanzklasse, wie beispielsweise HATU (O-(7-Azabenzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium Hexafluorophosphat; **214**), breite Anwendung finden. Der Reaktionsmechanismus in Abbildung 41 zeigt den nucleophilen Angriff eines Carboxylats (**200**) auf die O-Uroniumsalzvariante (**211**) von HBTU und die Reaktion zum Acylisoharnstoff (**212**). Letzterer wird durch OBt⁻ (**203**) in den OBt-Aktivester (**205**) überführt, welcher mit der zweiten Aminosäure (**207**) zum Dipeptid (**208**) umgesetzt wird. Das bei der Reaktion freiwerdende Wasser wird als Harnstoff (**213**) gebunden.

2.6 Enzymkinetik

Die *trans*-Epoxy-Peptide sollten aufgrund der elektrophilen Eigenschaften des Dreirings und ihrer Konfiguration in der Lage sein, mit einem Cystein-Rest in aktivem Zentrum des Enzyms eine kovalente Bindung einzugehen und dadurch das Enzym irreversibel zu hemmen. Für die *trans*-Epoxy-Peptide wird wegen ihrer Ähnlichkeit zu E-64 und CA074 ein vergleichbarer Inaktivierungsmechanismus angenommen. Auch *E*-Peptidylolefine sollten durch ihr α,β -ungesättigtes System Hemmstoffe für die Cysteinprotease darstellen, da das Michael-System ein elektrophiles System ist, welches vom Cystein-Rest des aktiven Zentrums nucleophil angegriffen werden kann. Durch den nucleophilen Angriff am Inhibitor wird das aktive Zentrum des Enzyms blockiert und das Enzym kann seine katalytische Funktion nicht mehr ausüben. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass der Inhibitor zwar in das aktive Zentrum bindet, aber die Alkylierung aufgrund einer sterisch ungünstigen räumlichen Anordnung nicht möglich ist.

Methoden, um zwischen reversibler und irreversibler Hemmung unterscheiden zu können, sind die Dialyse, die Ultrafiltration oder die Gelfiltration. Ein reversibler Inhibitor wird bei Verringerung der Inhibitor-Konzentration wieder aus dem Enzym-Inhibitor-Komplex abdissoziieren und das Enzym gewinnt seine Aktivität zurück. Allerdings haben diese Trennverfahren den Nachteil von Aktivitätsverlusten durch die Instabilität des Enzyms, weshalb immer ein Kontrollversuch ohne Inhibitor durchgeführt werden muss. Der tryptische Verdau eines durch einen Inhibitor inaktivierten Enzyms und die anschließende LC-MS-Analyse der dabei entstehenden Enzymfragmente ist eine weitere Methode, um eine irreversible kovalente Bindung nachzuweisen. Hierbei kann außerdem genau festgestellt werden, welches Verdau-Bruchstück und somit welche Aminosäure durch den Inhibitor alkyliert wurde. Einen Hinweis auf reversible oder irreversible Hemmung liefert auch die Betrachtung der Zeitabhängigkeit der Hemmung. Bei reversibler, zeitunabhängiger

Hemmung sinkt die Enzymaktivität durch Gleichgewichtseinstellung auf einen bestimmten Wert, der sich im Laufe der Messung dann nicht mehr ändert, vorausgesetzt es liegen Steady-State-Bedingungen vor ($[S] \gg [E]$, d.h. eine Sättigung des Enzyms mit Substrat). Bei irreversiblen Inhibitoren sinkt die Enzymaktivität im Laufe der Zeit immer weiter ab, was bei einer Reaktion pseudo-erster Ordnung zu einem exponentiellen Verlauf führt. Ist jedoch der zweite Reaktionsschritt, die Bildung des kovalenten Enzym-Inhibitor-Addukts sehr langsam kann auch bei irreversiblen Inhibitoren eine nicht-zeitabhängige Hemmung beobachtet werden.^[265]

2.6.1 Charakterisierung irreversibler Hemmung

Die irreversible Bindung eines Inhibitors an ein Enzym in Gegenwart eines Substrats kann mit folgendem Reaktionsschema beschrieben werden. Der Inhibitor bildet mit dem Enzym einen Assoziationskomplex, der entweder wieder dissoziieren oder weiter zu einem inaktivierten Enzym reagieren kann. In Gegenwart eines Substrats kommt es gleichzeitig zur Konkurrenz des Substrats mit dem Inhibitor um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms. Ein Maß für die Affinität des Substrats zum Enzym ist die Michaelis-Konstante K_m , diejenige Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist.

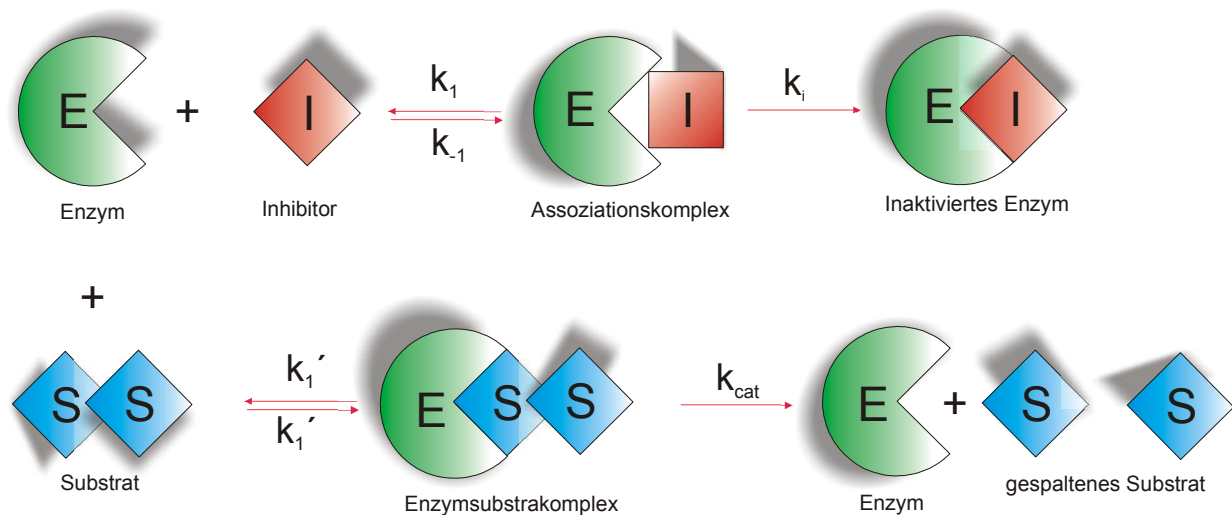


Abbildung 42: Irreversible Bindung eines Inhibitors an ein Enzym in Gegenwart eines Substrats.^[266]

- K_i [M] = Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt, als $K_i = [E][I]/[EI]$ oder $K_i = (k_{-1} + k_i)/k_1$ definiert ist, und ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor darstellt. Da der 2. Schritt

geschwindigkeitsbestimmend ist und k_i das Gleichgewicht zwischen Enzym-Inhibitor-Komplex [E-I] auf der einen Seite und freiem Enzym [E] und Inhibitor [I] auf der anderen Seite nicht beeinflusst, vereinfacht sich die Gleichung weiter zu $K_i = k_{-1} / k_1$.

- k_i [s^{-1}] = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms [E-I].
- k_{2nd} [$M^{-1} \cdot s^{-1}$] = Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung des Enzyms. Sie berechnet sich zu $k_{2nd} = k_i / K_i$ und fasst die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor und die Inaktivierung zum Enzym-Komplex [E-I] zusammen. Je schneller die Inaktivierung, desto größer k_i und je besser die Affinität zum Enzym, desto kleiner ist die Dissoziationskonstante K_i , was zur Folge hat, dass ein großer k_{2nd} -Wert resultiert.

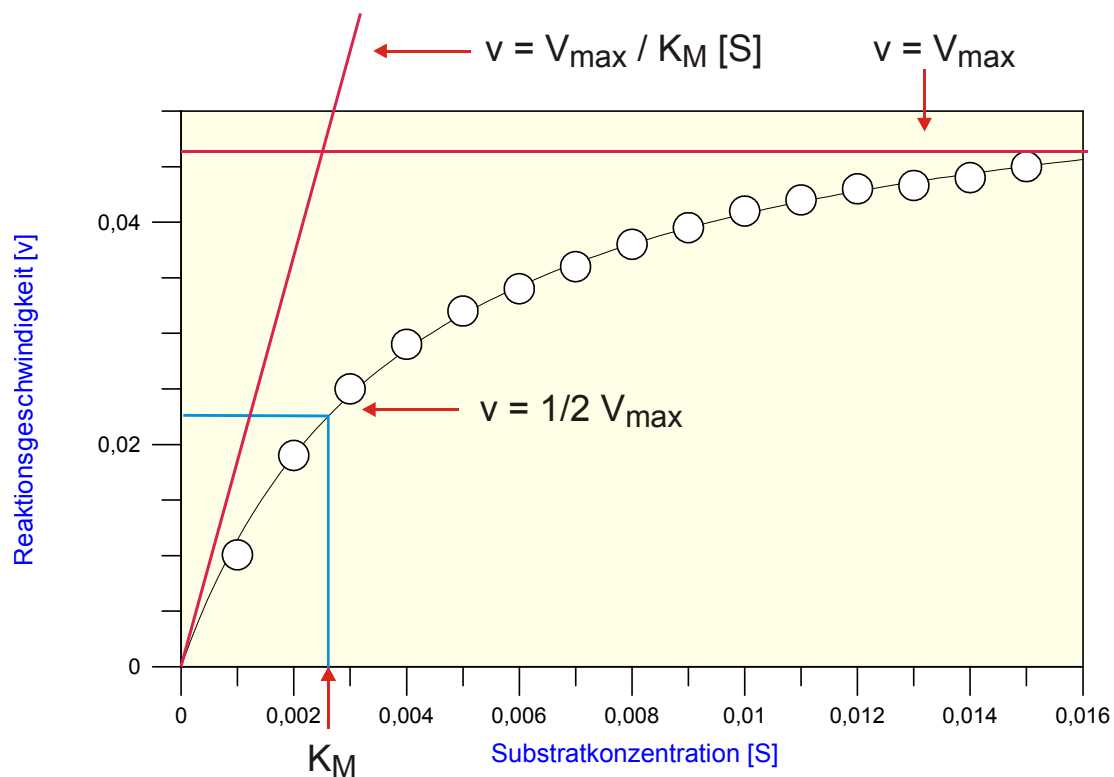


Abbildung 43: Michaelis-Menten-Kinetik. ^[267]

Bei definierten Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH, Ionenstärke) ist k_{2nd} für ein Enzym-Substrat-Paar unabhängig von der Enzymkonzentration. ^[267] Zusammen mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} , die etwas über die Geschwindigkeit der Umwandlung des Substrats in das Produkt aussagt, dient K_M zur Charakterisierung einer enzymatischen Reaktion. Bei einem irreversiblen Inhibitor wird die Inaktivierung durch die Hemmkonstanten K_i , k_i , k_{2nd} beschrieben. ^[265,266,268]

Aus dem Reaktionsschema für die irreversible Bindung eines Inhibitors an ein Enzym in Gegenwart eines Substrats (Abbildung 42) ergibt sich die Gesamtkonzentration (Gleichung 1) an eingesetztem Enzym $[E_0]$ zu:

$$\text{Gleichung 1} \quad [E_0] = [E] + [EI] + [E-I]$$

$[E] \rightarrow$ Konzentration an freiem Enzym, $[EI] \rightarrow$ Konzentration an reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex (noch potentiell aktives Enzym), $[E-I] \rightarrow$ Konzentration an inaktiviertem Enzym. Unter der Bedingung $[I] \gg [E_0]$ (Bedingungen pseudo-erster Ordnung) ist die Bildung der inaktiven Enzymform $[E-I]$ proportional zur Konzentration des reversiblen Komplexes $[EI]$ (Gleichung 2).

$$\text{Gleichung 2} \quad \frac{d[E-I]}{dt} = k_i[EI]$$

Im Assoziationskomplex $[EI]$ ist das Enzym noch nicht vollständig inaktiviert, so dass der Inhibitor durch einen Überschuss an Substrat wieder aus der Bindung mit dem Enzym verdrängt werden kann. Das Enzym ist im Assoziationskomplex $[EI]$ also noch potentiell aktiv und kann zusammen mit dem freien Enzym $[E]$ zum aktiven Enzym $[E_a] = [EI] + [E]$ zusammengefasst werden.^[269] Da die Gesamtkonzentration an Enzym $[E_0]$ aber konstant bleibt, entspricht die Bildung des inaktiven Komplexes $[E-I]$ der Abnahme an aktivem Enzym $[E_a]$. Durch Einsetzen in Gleichung 2 folgt:

$$\text{Gleichung 3} \quad \frac{-d[E_a]}{dt} = k_i[EI]$$

Für die Gleichung der Dissoziationskonstanten $K_i = [E][I] / [EI]$ erhält man durch Einsetzen von $[E_a] = [EI] + [E]$ und Umformen die Gleichung für die Konzentration des Assoziationskomplexes $[EI] = [E_a] / (1 + K_i / [I])$. Durch Einsetzen in Gleichung 3 ergibt sich für die Abnahme der Enzymaktivität die Gleichung 4:


$$\text{Gleichung 4} \quad \frac{-d[E_a]}{dt} = \frac{k_i [E_a]}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)}$$

Integration über die Zeit t liefert Gleichung 5:

$$\text{Gleichung 5} \quad \ln \left(\frac{[E_a]}{[E_0]} \right) = \frac{-k_i t}{1 + \frac{K_i}{[I]}}$$

Unter Steady-State-Bedingungen folgt die Abnahme der Enzymaktivität einer Kinetik pseudo-erster Ordnung ($\ln ([E_a] / [E_0]) = -k_{obs} t$) mit k_{obs} als Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung, und es ergibt sich Gleichung 6 und eine hyperbolische Funktion (Abbildung 44).

Gleichung 6
$$-k_{obs}t = \frac{-k_i t}{\left(1 + \frac{k_i [I]}{K_i}\right)}$$



Gleichung 6
$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_i + [I]}$$

Aus Gleichung 6 ergibt sich, dass die Hemmkonstanten K_i und k_i unabhängig von der verwendeten Enzymkonzentration sind. Nach Ermittlung von k_{obs} -Werten für unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen können K_i und k_i durch nichtlineare Regression bestimmt werden.

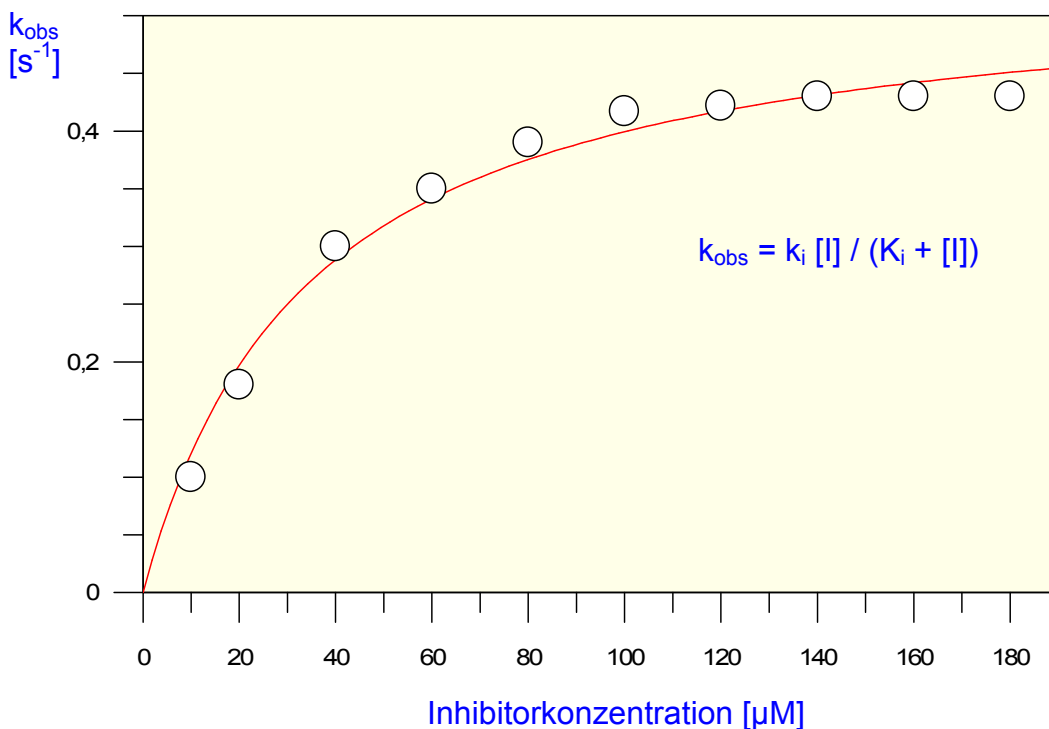


Abbildung 44: k_{obs} gegen $[I]$ bei zeitabhängiger Hemmung unter Sättigungsbedingungen.

Hemmkonstanten schlecht löslicher oder schnell reagierender Inhibitoren können nicht unter Sättigungsbedingungen $[I] \gg K_i$, sondern nur bei relativ niedrigen Inhibitorkonzentrationen unterhalb der Dissoziationskonstanten $[I] \ll K_i$ bestimmt werden.

Gleichung 6 vereinfacht sich dann zu Gleichung 7:

Gleichung 7 $k_{\text{obs}} = k_i [I] / K_i + [I]$ \longleftrightarrow $k_{2\text{nd}} = k_i / K_i = k_{\text{obs}} / [I]$

Die Hemmkonstanten k_i und K_i können damit nicht mehr einzeln bestimmt werden, sondern es wird näherungsweise nur die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung $k_{2\text{nd}}$ berechnet, die sich beim Auftragen von k_{obs} gegen $[I]$ aus der Steigung der erhaltenen Geraden ergibt (Abbildung 45).

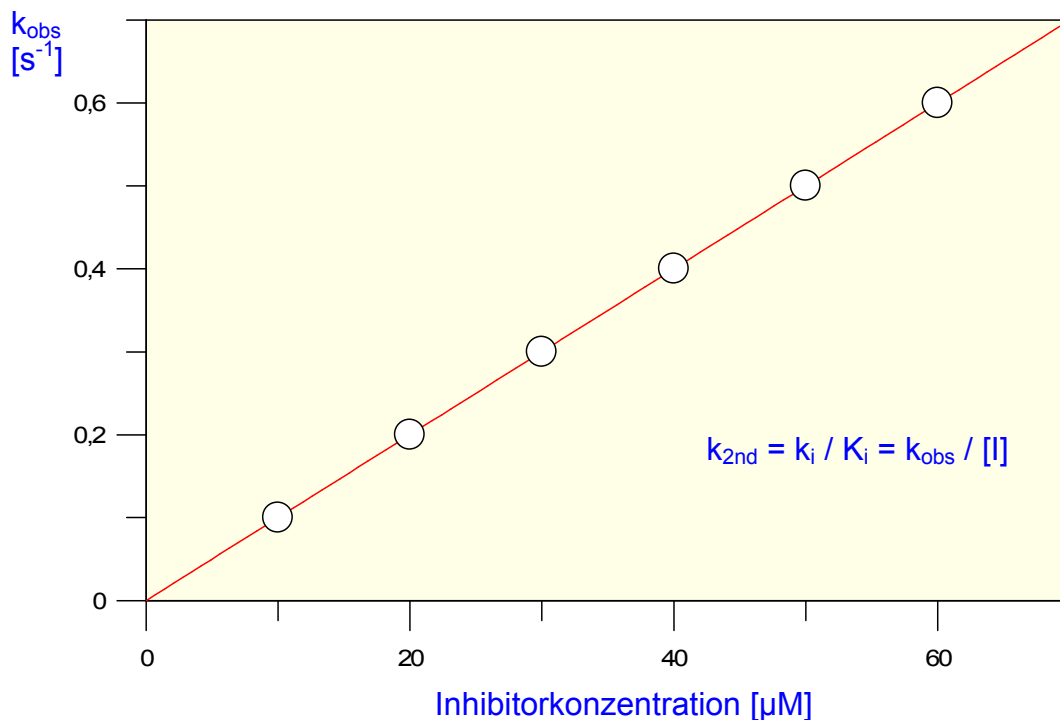


Abbildung 45: k_{obs} gegen $[I]$ bei $[I] \ll K_i$; Bestimmung von $k_{2\text{nd}}$.

Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird, wenn kompetitive Hemmung vorliegt jedoch nicht der wahre K_i -Wert, sondern nur die apparente Dissoziationskonstante $K_{i\text{app}}$ bestimmt. Grund hierfür ist die Konkurrenz von Inhibitor und Substrat um die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms, wodurch die Substratkonzentration $[S]$ und die Affinität des Substrats zum Enzym berücksichtigt werden müssen. Um den von diesen Faktoren unabhängigen K_i zu berechnen muss deshalb der Wert von $K_{i\text{app}}$ durch den Term $(1 + [S] / K_M)$ dividiert werden (Gleichung 8).

Gleichung 8 $K_{i\text{app}} = K_i (1 + [S] / K_M)$

Durch zwei verschiedene Methoden, einem kontinuierlichen Assay nach Tian und Tsou^[270] oder einem Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson^[269] können für unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen die k_{obs} -Werte ermittelt und so die Hemmkonstanten K_i , k_i , und k_{2nd} bestimmt werden.

2.6.2 Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou

Wird bei einer Mischung aus Inhibitor, Enzym und Substrat die zeitabhängige Produktzunahme gemessen, so nimmt die Zunahme des Produktes in Anwesenheit eines irreversiblen Inhibitors exponentiell ab und nähert sich so einer Produktkonzentration $[P^\infty]$ (Gleichung 9).^[265,266]

Gleichung 9 $[P]_t = [P]_\infty (1 - e^{(-k_{obs}t)})$

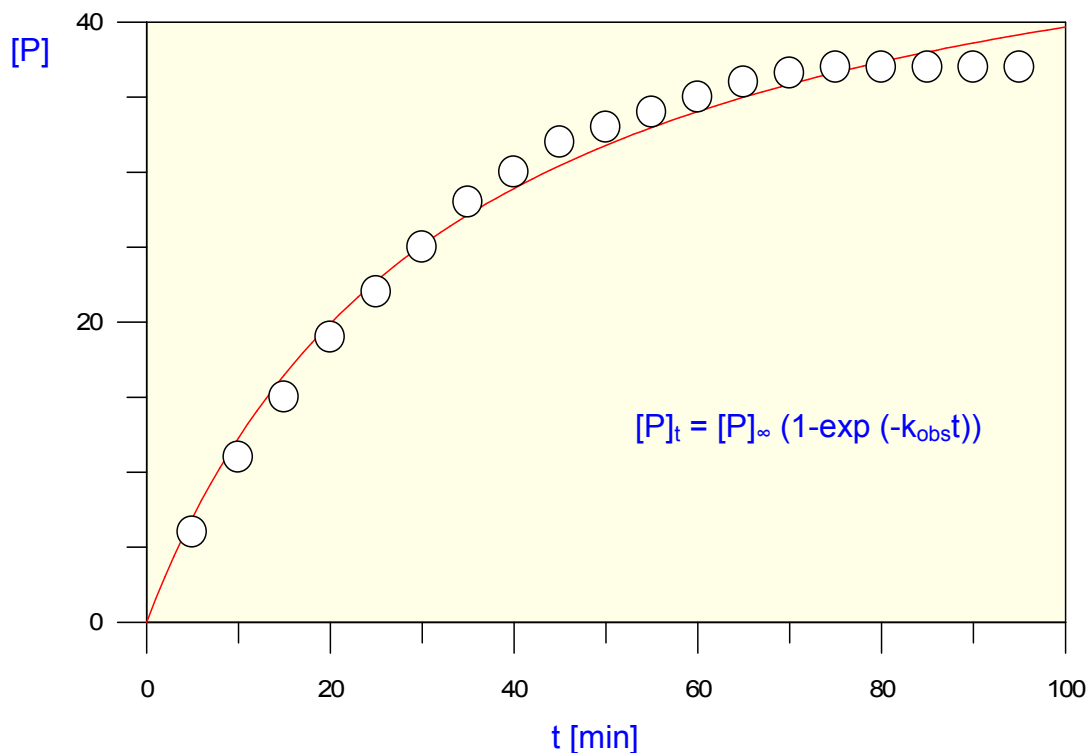


Abbildung 46: Umsatz-Zeit-Diagramm eines kontinuierlichen Assays bei zeitabhängiger, irreversibler Hemmung; Bestimmung von k_{obs} .

Voraussetzung dafür sind Steady-State-Bedingungen. Um diese über die ganze Zeit der Messung (30 min) zu gewährleisten, müssen Inhibitor und Substrat in ausreichendem Überschuss vorliegen ($[I] \gg [E_0]$, $[S] \gg [E_0]$), damit die Abnahme der Aktivität auch

tatsächlich auf die Reaktion mit dem Inhibitor zurückzuführen ist. Die Umsatz-Zeit-Kurve des Enzyms mit dem Substrat muss über die gesamte Messzeit linear verlaufen. Es wird maximal 10% Abweichung von der Linearität toleriert (Abbildung 46). Durch nichtlineare Regressionsanalyse mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit[®][271] werden für jede Inhibitor-konzentration die k_{obs} -Werte ermittelt. Trägt man diese gegen die Inhibitorkonzentration auf, so lassen sich gemäß Gleichung 6, 7 und 8 die Hemmkonstanten k_i , K_i und k_{2nd} bestimmen.^[266]

2.6.3 Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson

Eine definierte Konzentration an Enzym wird mit einem 10-50-fachen Überschuss an Inhibitor ($[I] \gg [E_0]$, nach Bedingungen pseudo-erster Ordnung) inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen (t_1 - t_5) wird ein Aliquot aus der Inkubationslösung entnommen und nach Zugabe von Substrat die Restaktivität des Enzyms $[E_a]$ ($[E_1]$ - $[E_5]$) bestimmt (Abbildung 47). Dieses Aliquot wird dabei vor Substratzugabe mindestens um den Faktor 4-5 verdünnt, um einer Hemmung durch nicht-kovalente Assoziation vorzubeugen.^[269]

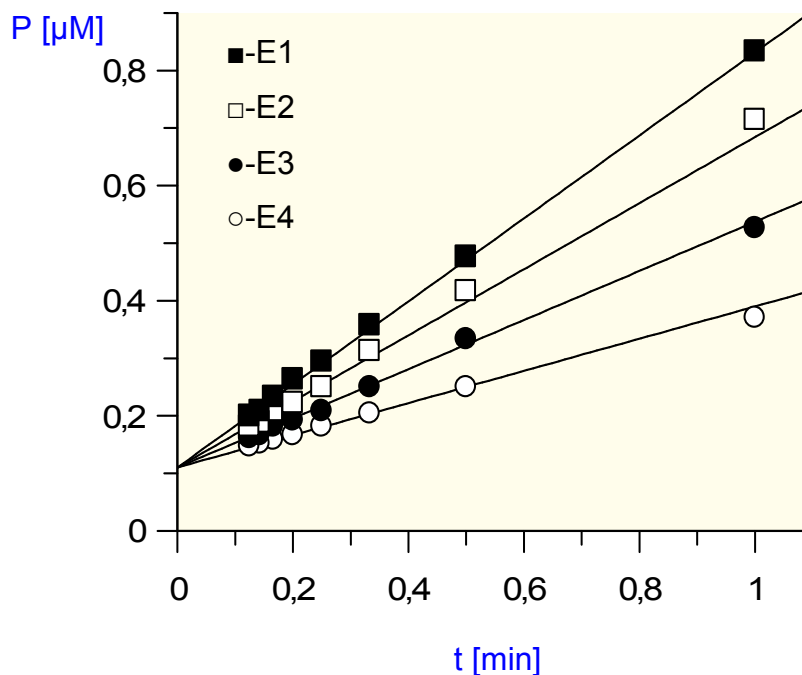


Abbildung 47: Umsatz-Zeit-Diagramm bei irreversibler Hemmung, Rest-Enzymaktivität von zu verschiedenen Zeiten entnommen Aliquots.^[269]

Durch Auftragung der Steigungen der erhaltenen Geraden gegen die gewählten Zeitabstände, wird eine abfallende Exponentialkurve ($[E_a] = [E_0] e^{-k_{obs}t}$) erhalten (Abbildung 48), aus

der durch nicht-lineare Regression der k_{obs} -Wert für die eingesetzte Inhibitorkonzentration ermittelt werden kann. Der große Nachteil dieser Methode liegt im großen Zeitaufwand, da dieses Verfahren für mehrere Inhibitorkonzentrationen wiederholt werden muss, um k_{obs} gegen $[I]$ auftragen zu können. ^[265]

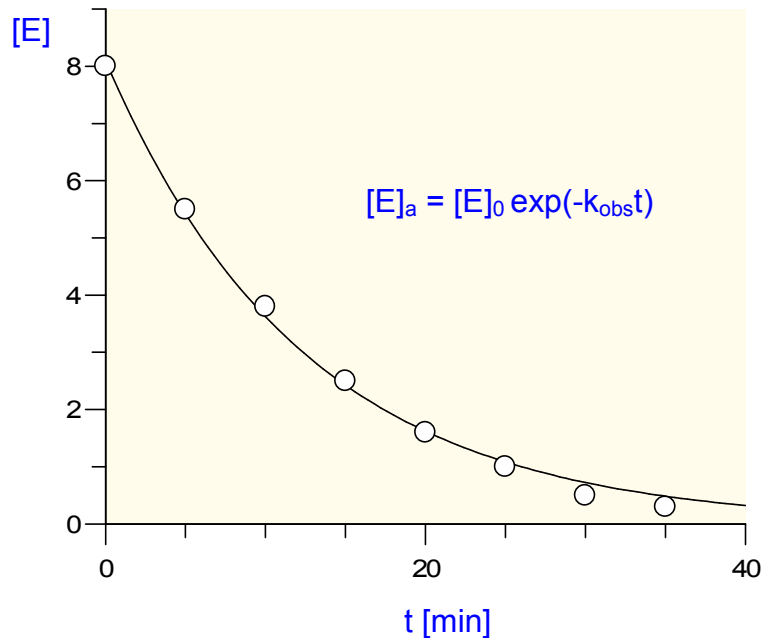


Abbildung 48: Abfallende Exponentialkurve zur Ermittlung von k_{obs} .

2.6.4 Charakterisierung nicht-zeitabhängiger Hemmung

Bei sehr langsamer Inaktivierung des Enzyms durch den Inhibitor verläuft die Umsatz-Zeit-Kurve nahezu linear, so dass es unmöglich ist, die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung zu bestimmen. In diesem Fall wird, genauso wie bei reversibler Hemmung, für die Auswertung der Assays die Dixon-Gleichung **10** benutzt. ^[272]

Gleichung 10
$$v_i = v_0 / (1 + [I] / K_i)$$

v_i und v_0 sind die Enzymaktivitäten mit bzw. ohne Inhibitor, die durch Ermittlung der Steigung der Umsatz-Zeit-Kurven in den ersten 10 min der Enzymreaktion mit bzw. ohne Inhibitor bestimmt werden. Durch Auftragung von v_0/v_i gegen $[I]$ wird der Dixon-Plot linearisiert und man kann aus der Steigung der erhaltenen Geraden den reziproken K_i -Wert erhalten (Abbildung 49). Der K_i -Wert kann auch durch nichtlineare Regression der v_i gegen $[I]$ -Kurve des Dixon-Plots ermittelt werden. Auch bei der nicht-zeitabhängigen Hemmung kommt es bei kompetitiver Hemmung zu einer Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat, so dass die

ermittelte apparente Dissoziationskonstante K_{iapp} ebenfalls durch Division durch den Term $(1 + [S] / K_M)$ korrigiert werden muss. Der so erhaltene K_i -Wert ist im Gegensatz zum K_{iapp} -Wert, der bei kompetitiver Hemmung dem IC_{50} -Wert entspricht, unabhängig vom Substrat, dessen Konzentration und dem K_M -Wert.

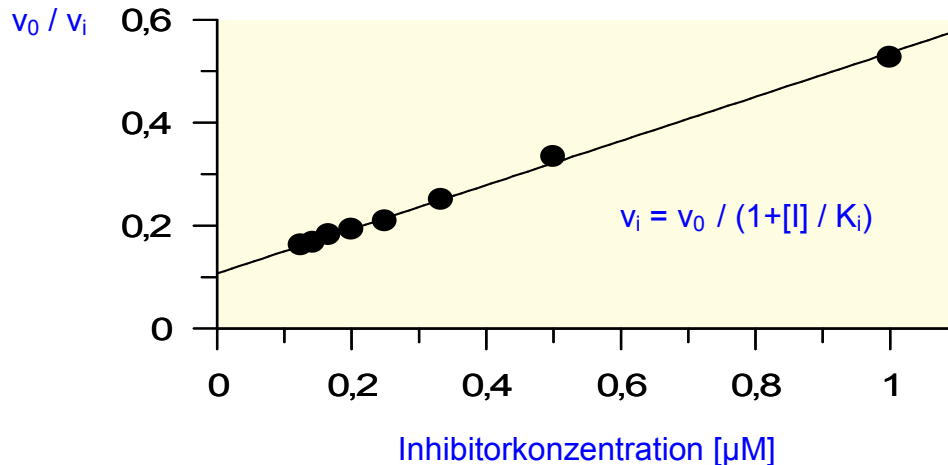


Abbildung 49: Linearisierter Dixon-Plot bei zeitabhängiger Hemmung; Ermittlung von K_i .^[272]

2.7 Cyclodepsipeptide

Für die pharmazeutische Industrie ist die Erforschung der Biosynthese von Antibiotika von besonderem Interesse, da eine Synthese der oft kompliziert aufgebauten Verbindungen auf chemischen Wege nur mit erheblichen Aufwand zu bewerkstelligen wäre. Nicht zuletzt kommt auch der Modifizierung von bereits bekannten Leitstrukturen zur Auffindung neuer Wirkstoffe eine erhebliche Bedeutung zu. Diese Aufgabe kann durch den Einsatz biotechnologischer Verfahren, z.B. gerichtete Biosynthese („directed biosynthesis“)^[273] oder „Chemoenzymatische-Synthese“^[274,275] mit wesentlich einfacheren Mitteln bewältigt werden, als das bei der chemischen Totalsynthese der Fall wäre. Bei den attraktiven Wirksubstanzen, die von Bakterien, Hefen oder Pilzen produziert werden, handelt es sich vorwiegend um Produkte des Sekundärmetabolismus.

In der Hoffnung einen Erfolg mit mikrobiellen Naturstoffen zu erzielen, wie es bei dem Antibiotikum Penicillin und dem Immunosuppressivum Cyclosporin der Fall war, wurden von der japanischen Firma Meiji Seika Kaisha sämtliche Sekundärmetabolite aus verschiedenen Pilzen gescreent. Dabei wurde zufällig bei dem filamentös wachsenden Pilz aus der Gruppe der Agonomycetales („*Mycelia sterilia*“) ein interessanter Sekundärmetabolit, PF 1022A,

entdeckt. Weitere Tests ergaben, dass der isolierte Sekundärmetabolit eine anthelmintische Wirkung hat, dabei aber keine Nebenwirkungen, wie z.B. eine antibiotische Wirkung gegen den Wirt aufwies.

2.7.1 Peptidantibiotika

Es ist bekannt, dass Mikroorganismen zahlreiche antibiotisch wirksame Sekundärmetabolite produzieren. Die Mechanismen antimikrobieller Wirkungen sind vielfältig und nur teilweise aufgeklärt. Unter anderem unterdrücken Antibiotika die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit von Zellen sehr spezifisch, z.B. greifen sie in die Zellwandbiosynthese; Vancomycin (**215**), die Transkription; Rifamicin (**216**), die Replikation; Daunomycin (**217**) und Actinomycin sowie die Translation; Puromycin (**218**) und Chloramphenicol (**219**) ein (Abbildung 50). Peptidantibiotika sind eine Klasse von Sekundärmetaboliten, welche aus Aminosäuren aufgebaut sind.

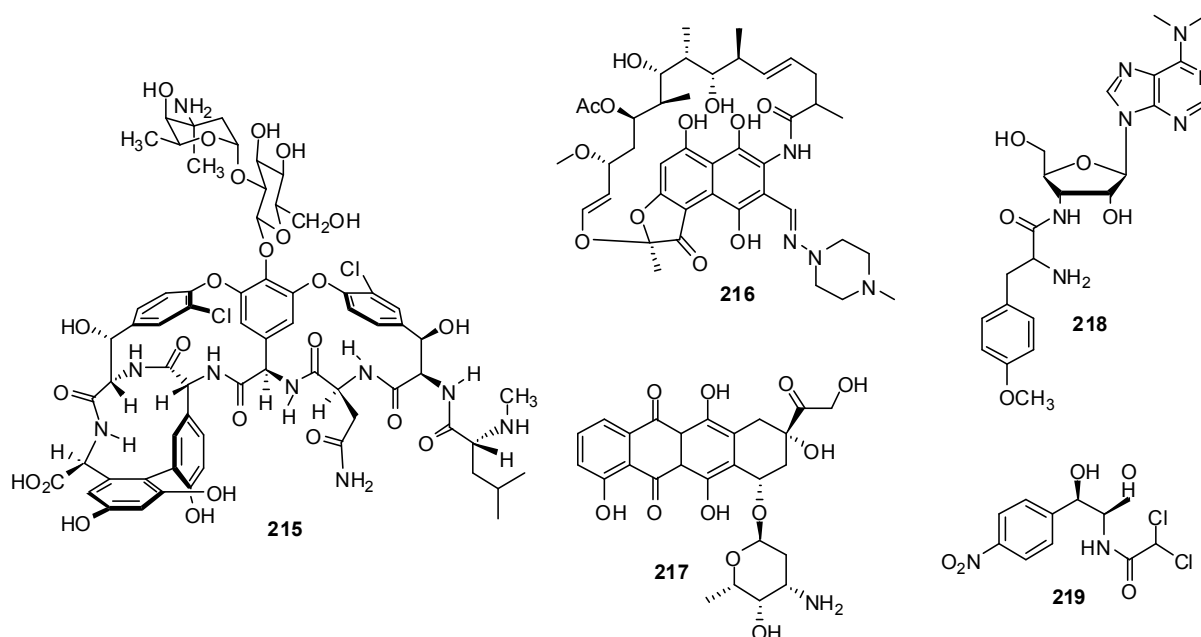


Abbildung 50: Strukturen antibiotischer Sekundärmetabolite: Vancomycin (**215**), Rifamicin (**216**), Daunomycin (**217**), Puromycin (**218**) und Chloramphenicol (**219**).

Ein Charakteristikum dieser Sekundärmetabolite ist, dass sie nicht-proteinogene Aminosäuren wie z.B. D-Aminosäuren besitzen. In ihren Strukturen finden sich auch sehr häufig α - und β -Hydroxycarbonsäuren sowie β -Aminocarbonsäuren wieder. Ein häufig auftretendes Charakteristikum ist eine zyklische Struktur, welche durch eine Peptid-, Lacton-, oder Esterbindung gebildet wird.^[276] Die Synthese der Sekundärmetaboliten beginnt, sobald die schnell verfügbaren Kohlenstoff-, Stickstoff-, und Phosphorquellen aufgebraucht sind,

was eine radikale Umstellung des gesamten Stoffwechsels erfordert.^[277] Die Funktion der Peptidantibiotika für die produzierenden Organismen konnte bisher nicht geklärt werden. Es gibt lediglich Hinweise auf Selektionsvorteile durch Erhöhung der Resistenz gegen schädliche Umwelteinflüsse.^[278]

2.7.2 Peptidsynthetasen

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die Synthese des größten Teils der Peptidantibiotika nichtribosomal erfolgt.^[279] Die Biosynthese wird von einem oder mehreren Multienzymen katalysiert die als sogenannte Protein-Schablone („template“), gemäß dem von Lipmann 1973 formulierten Thiotemplate-Mechanismus arbeiten.^[280] Die ersten charakterisierten Peptidantibiotika waren die cyclischen Decapeptide Tyrocidin^[281] und Gramicidin S^[282] aus *Bacillus brevis*. Die von ihnen produzierten Enzyme, die Peptidsynthetasen, wurden als multifunktionelle Proteine mit bis zu sechs Aminosäure-aktivierende Funktionen erkannt. Als Cofaktor enthalten sie in kovalent gebundener Form das 4'-Phosphopantethein, dem auch in der Fettsäurenbiosynthese als prosthetische Gruppe des Acyl-Carrier-Proteins eine entscheidende Rolle zukommt. Wie bei der Fettsäurenbiosynthese katalysiert das 4'-Phosphopantethein auch im Falle der Peptidsynthetasen den Reaktionsschritt der Elongation.

Bei allen bisher bekannten Peptidsynthetasen konnte ein modularer Aufbau festgestellt werden. Es existieren räumlich voneinander getrennte, reaktive Domänen, die jeweils spezielle Funktionen übernehmen, z. B. die Aktivierung des Substrats als Adenylat oder *N*-Methylierung einer Peptidbindung. Durch die modulare Anordnung der multifunktionellen Enzyme reduziert sich die für jeden Pathway benötigte Anzahl an Genen beträchtlich. Die Sekundärmetabolite der Pilze werden über einzelne Multienzyme synthetisiert, die alle notwendigen Funktionen auf einer einzigen Polypeptidkette vereinen. Vertreter dieser Sekundärmetabolite sind z.B. die Cyclohexadepsipeptide Enniatin (Fusarien),^[283] Beauvericin (*Beauveria bassiana*)^[284,285] bzw. *Fussarium proliferatum*,^[286] sowie die Cyclooctadepsipeptide PF1022 und Emodepsid (*Mycelia sterilia*) und Bassianolid (*Beauveria bassiana*).

2.7.3 NRPS der Cyclodepsipeptide (PF1022 und Enniatin)

Die nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) zählen zu den größten bekannten Enzymen. Die Enzyme werden funktional in verschiedene Module aufgeteilt, welche spezifische Aufgaben erfüllen. Bei den Fusarien (Cyclohexadepsipeptid, Enniatin, ESyn)^[287] oder *Mycelia sterilia* (Cyclooctadepsipeptid, PF1022, PFSyn)^[288] stellt man sich den Ablauf

der nichtribosomalen Peptidsynthese wie folgt vor: Mindestens drei essentielle enzymatische Arbeitsvorgänge sind für einen kompletten Elongationszyklus erforderlich: Initiation, Elongation und Termination. Neben den benötigten Domänen für die Initiation A (Adenylierung), für die Elongation T bzw. PCP (Thiolierung/peptidyl carrier protein), C (Kondensation) und für die Termination TE-Domäne (Thioesterase), gibt es optional bzw. alternativ weitere Domänen, wie z.B. Die Cy-Domäne (Cyclisierung, alternativ zur Kondensations- oder Terminationsdomäne), oder die M-Domäne (Methyltransferase, optional) und die E-Domäne (Epimerisierung, optional).

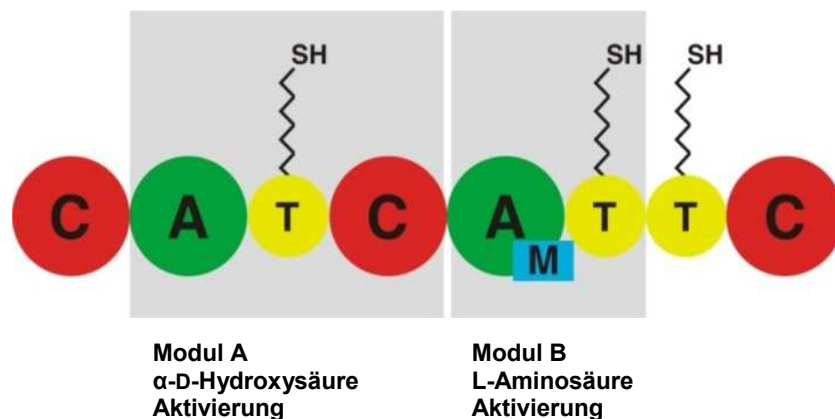


Abbildung 51: Aufbau der nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) von ESyn (Fusarien) und PFSyn (*Mycelia sterilia*). Die NRPS gliedert sich in zwei Module: Modul A ist für die Aktivierung der α -D-Hydroxysäuren, und Modul B für die Aktivierung der L-Aminosäuren zuständig.^[289]

Die Aufgabe der A-Domäne besteht in der Selektion der Substrate aus dem zellulär verfügbaren Pool und ihrer Aktivierung als Acyladenylat. Die Aktivierung der Aminosäure bei der ribosomalen Peptidsynthese durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase ähnelt der NRPS. Ein Schlüsselprinzip und zugleich der größte Unterschied zur ribosomalen Peptidsynthese ist die kovalente Verknüpfung der Substrate und Intermediate durch eine Thioesterbindung am Enzym. Nachdem das Substrat aktiviert ist, wird es auf einen 4'-Phosphopantetheinarm (Ppan), der als prosthetische Gruppe in der T- bzw. PCP-Domäne integriert ist übertragen. Dadurch ist ein effizienter und geregelter Transport der Substrate zu den aktiven Zentren gesichert; außerdem minimiert diese Strategie Nebenprodukte sowie den Zeitverlust durch Diffusion. Die C-Domäne erfüllt die Aufgabe der Kettenverlängerung Verknüpfung der aktivierten Substrate durch Kondensation. Im Falle der Zyklisierung wie z.B. bei PF1022 oder Enniatin, ist eine Cyclisierungsdomäne mit dem dazugehörigen Cyclisierungsraum notwendig.^[290] Die Cyclisierungsdomäne besitzt eine starke Ähnlichkeit mit der Kondensationsdomäne und kann daher gleichzeitig für die Abspaltung des fertig cyclisierten Peptids

vom Enzym sorgen. Ist keine Cyclisierungsdomäne vorhanden, so sorgt die TE-Domäne für die Termination. In vielen nichtribosomalen Peptiden sind *N*-methylierte Aminosäuren zu finden, wofür eine integrierte Methyltransferasedomäne notwendig ist (Enniatin und PF 1022).^[291,292]

2.7.4 Enniatine (Cyclohexadepsipeptide)

Die Cyclohexadepsipeptide (Enniatine) bestehen aus je drei Resten D-2-Hydroxyisovaleriat (D-Hiv) und einer verzweigtkettigen *N*-Methyl-L-Aminosäure: L-Isoleucin, L-Valin oder L-Leucin. Abhängig von der Struktur der eingebauten Aminosäuren unterscheidet man Enniatin A (**220**), B (**223**), C (**224**), und Hybridenniatin A1 (**221**), B1 (**222**) (in denen zwei verschiedene Aminosäuren gleichzeitig vorkommen). Die D-Hydroxy- und L-Aminosäuren sind alternierend miteinander durch Peptid- und Esterbindungen zu einem Cyclohexadepsipeptid verknüpft (Abbildung 52).^[293,294]

2.7.4.1 Physiologie der Enniatine

Viele Fusarien produzieren oft zusätzlich noch eine Reihe von Phytotoxinen,^[295] die bei verschiedenen Pflanzen Schäden wie z.B. Welken verursachen.^[296] Zusammen mit Lycomarasminsäure, Fusarinsäure, Fusarubin und Javanicin verursachen Enniatine z.B. Nekrosen bei Pflanzen, indem sie ihren Wasserhaushalt beeinflussen.^[296] Die Stärke der Toxizität könnte von der Fähigkeit abhängen, die Membranen für Ionen durchlässiger zu machen, dadurch das Membranpotential aufzuheben und im Umkehrschluss den ATP-Verbrauch der Zelle zu erhöhen.^[297] Enniatin B (**223**) kann Alkalimetallionen in internen Komplexen binden; dies erfolgt über die drei Carbonylgruppen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Natrium-Ionen am besten durch die drei Carbonylgruppen von Enniatin B (**223**) komplexiert werden.^[298] Kalium- und Rubidium-Ionen können nur unter Verzerrung des internen Liganden-Komplexes gebunden werden, und Cäsium-Ionen können nur externe Komplex bilden.^[299] In der Zelle wirkt Enniatin insbesondere die hydrophoben Gruppen ionophor. Der Transport der Alkalimetallionen durch die Membran erfolgt vermutlich über einen „Sandwich-Komplex“. Dieser Komplex setzt sich aus zwei Molekülen Enniatin zusammen welche sich in die Membran einlagern, dabei ein Metall-Ion komplexieren und dadurch dessen Ausschleusung aus der Zelle ermöglichen.^[300] Eine Unterbrechung des Enniatin-Synthase-Gens in *Fusarium avenaceum* führte zu einer signifikanten Erniedrigung der Virulenz gegenüber Kartoffelknollengewebe.^[301]

Enniatine sind Inhibitoren der Acyl-CoA Cholesterin Acyltransferase (ACAT) aus Säugetieren. Die Hemmung von ACAT gilt als vielversprechender Ansatz für die Behandlung von Arteriosklerose und Hypercholesterinämie.^[302] Bei den Inhibitions-Testungen an ACAT zeigten die hydrophoben Enniatin-Derivate (**227**; **220**) höhere Aktivitäten als die weniger hydrophoben Derivate, wobei Beauvericin (**228**) die eindeutig stärkste Aktivität aufwies.^[303] Bei der Untersuchung des GABA_A-Rezeptors fand man, dass Enniatin A (**220**) einer der potentesten Inhibitoren darstellt, es verdrängte ³⁵S-TBPS (*tert*-Butylbicyclophosphorthionat) von den Bindungsstellen des Rezeptors an den kortikalen Membranen von Ratten fünfmal so stark als das sehr ähnliche Enniatin B (**223**).^[304,305] Enniatin B bindet z.B. auch an Calmodulin und inhibiert die 3'-5'-cyclische Nucleotid-Phosphodiesterase (PDE).^[306] Andere Calmodulin-abhängigen Enzyme sind z.B. die Cyclische Nucleotidasen, Proteinkinasen und Phospholipase A₂. Bemerkenswert sind außerdem die antibiotische,^[307] insektizide,^[308] anti-HIV und immunomodulatorische Aktivität der Enniatine.^[309]

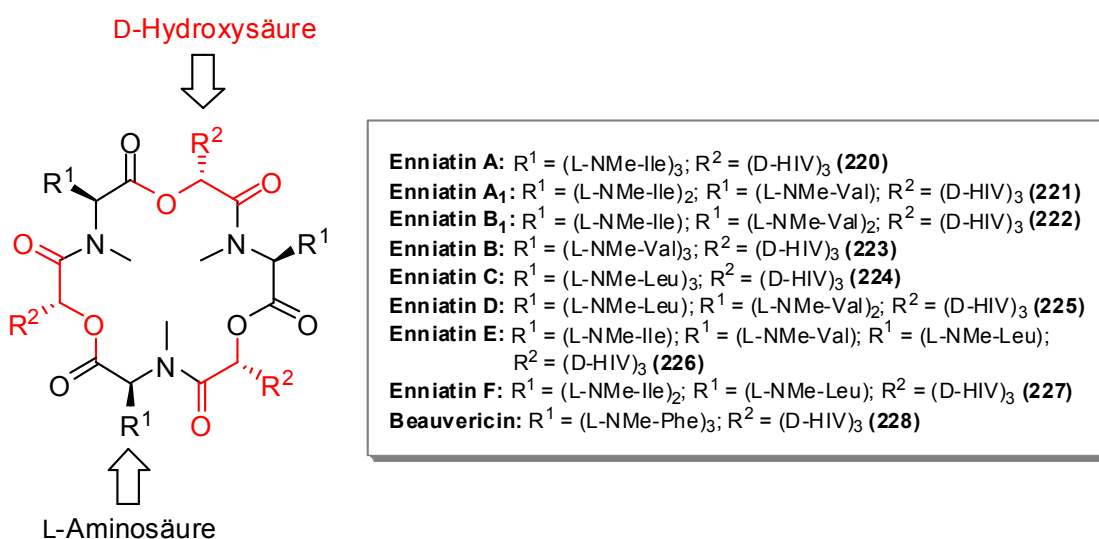


Abbildung 52: Natürlich vorkommende Enniatin-Derivate (Fusarien), und struktureller Aufbau der Cyclohexadepsipeptide.^[310]

Für einen möglichen pharmazeutischen Gebrauch hat die Verwendung der Enniatine den Vorteil, dass sie als *N*-methyliertes Depsipeptid stabil gegenüber Proteasen und Esterasen sind, und somit eine orale Applikation möglich ist. Die Vielzahl der *in vitro* gefunden Wirkungen können in der Zukunft zu weiteren pharmazeutischen Anwendungen führen. Fusafungin, eine Mischung aus Enniatin A (**220**), A₁ (**221**), B (**222**) und B₁ (**223**), wird als Hustenaerosol mit einer Wirkung gegen Gram-positive Bakterien vertrieben.^[311]

2.7.5 PF 1022 (Cyclooctadepsipeptide)

Die Cyclooctadepsipeptide mit der Bezeichnung PF 1022 wurden 1990 als Produkte des Sekundärmetabolismus eines bis dato unbekannten filamentösen Pilzes entdeckt.^[312,313] Dieser Organismus, ein imperfekter Pilz aus der Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze), wird aufgrund der bislang bekannten morphologischen Kriterien der taxonomischen Gruppe der *Agonomycetales* (*Mycelia sterilia*) zugeordnet. *Mycelia sterilia* PF 1022 produziert mehrere Vertreter der interessanten Verbindungsklasse, wobei PF 1022A, welches sich durch eine starke anthelmintische Aktivität gegen unterschiedliche Nematoden auszeichnet als Hauptprodukt auftritt.^[314] In seiner chemischen Struktur gleicht das PF 1022-Grundgerüst bereits früher gefundenen Cyclodepsipeptiden, wie dem Bassianolid, einem aus *Beauveria bassiana* isoliertem Antibiotikum mit insektizider Wirkung,^[315] oder dem Amidomycin aus *Streptomyces*, welches antibiotische Wirkung gegen verschiedene Hefen besitzt.^[316]

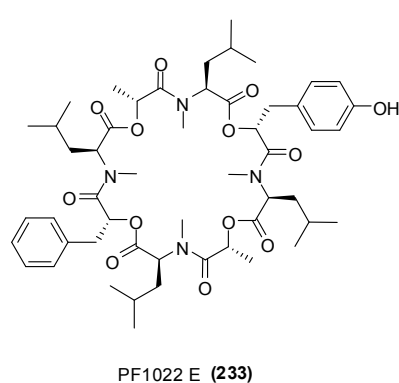
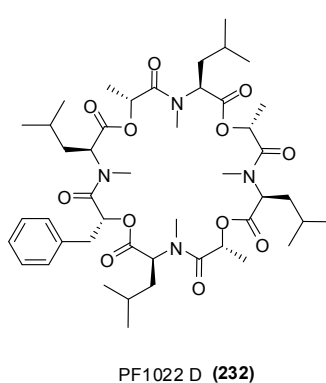
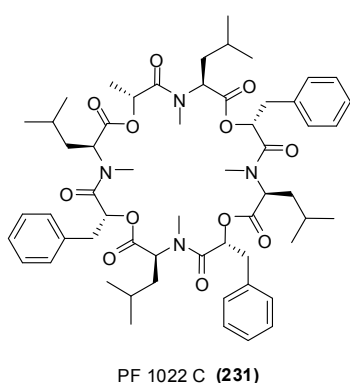
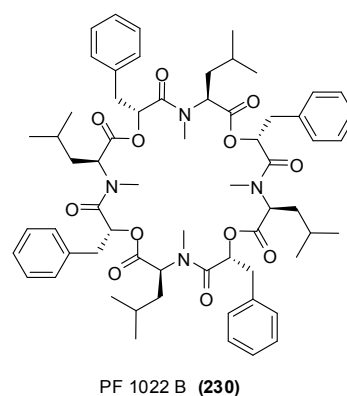
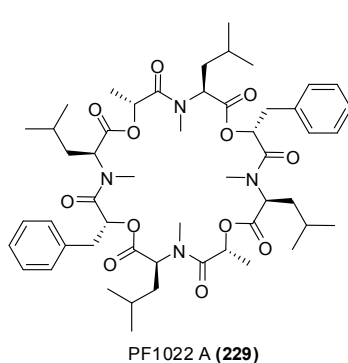
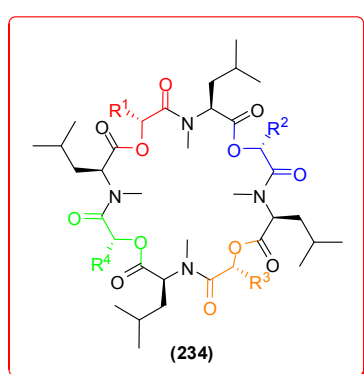


Abbildung 53: Allgemein Struktur der PF 1022-Homologen und des Bassianolids (R^1 - R^4). Das 24-gliedrige Ringsystem enthält alternierende Ester- und Peptidbindungen (234). Alle Stickstoffatome liegen in methylierter Form vor. Kurze, verzweigte Kohlenwasserstoffreste verleihen dem Molekül seinen unpolaren Charakter (Tabelle 4).

PF 1022 besteht wie seine chemisch verwandten Naturstoffe aus alternierenden Einheiten von Aminosäuren (*N*-Methyl-L-Leucin), und α -D-Hydroxysäuren. Neben der Hauptkomponente PF 1022A (**229**) ist ein ganzes Spektrum weiterer natürlich vorkommender Derivate bekannt (Abbildung 53). Sie leiten sich alle von demselben 24-gliedrigen Ringsystem ab, und unterscheiden sich lediglich in den Seitengruppen der Hydroxysäuren. Als Substituenten treten sowohl Alkyl-, als auch Aryl-Reste auf, welche zudem teilweise hydroxyliert sein können (Tabelle 4).

Tabelle 4: Natürlich vorkommende Cyclooctadepsipeptide

Derivat	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
PF 1022A (229)	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅
PF 1022B (230)	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅
PF 1022C (231)	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃
PF 1022D (232)	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
PF 1022E (233)	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ OH	-CH ₃
PF 1022F (235)	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃

Das schon früher beschriebene Bassianolid aus dem pathogenen Insekten-Pilz *Beauveria bassiana* besitzt eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu den PF 1022-Derivaten. Der einzige Unterschied besteht in den Hydroxysäuren-Seitenketten. Es besteht auch eine sehr nahe Verwandtschaft zu den Hexadepsipeptiden Beauvericin (**228**) und Enniatin.^[285] Die Enniatine, welche vom imperfekten Pilzen der Gattung *Fusarium* produziert werden, als auch die natürlichen PF 1022-Homologen enthalten vorwiegend hydrophobe Seitenketten, die für die gute Löslichkeit in Lipiden und organischen Lösungsmitteln verantwortlich sind. Bei annähernd planarer Molekülstruktur besitzt der PF-1022-Ring (**234**) acht Heteroatome (Carbonylgruppen), die koordinativ Bindungen mit Kationen, vorwiegend Alkali- und Erdalkalimetalle, ermöglichen. Daraus resultiert, wie auch schon bei den Enniatinen, der ionophore Charakter der PF 1022-Homologen. Die Naturstoffe der PF-1022-Reihe besitzen im Gegensatz zu den Enniatinen keine antimikrobiellen Eigenschaften.

Wie bereits erwähnt, wirken Enniatine gegen zahlreiche bakterielle^[317] Krankheitserreger und werden daher in der Form des Enniatin-Gemisches Fusafungin (Locabiotol) zur Behandlung von Infektionen verwendet.^[309] In den Jahren 1994 und 1995 wurden zahlreiche Verfahren zur Totalsynthese von PF 1022A (**229**) und Derivaten publiziert.^[318-320] Durch eine konvergente Syntheseführung war es möglich in relativ guten Ausbeuten die gewünschten Depsipeptide zu erhalten. Dennoch ist eine großtechnische Produktion (chemische Synthese) wegen der hohen Kosten bis jetzt nicht von kommerziellem Interesse.

Tabelle 5: Semisynthetische PF 1022-Derivate.

Derivat	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
PF 1022-220 (236)	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ NH ₂	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ NH ₂
PF 1022-221 (237)	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ N(C ₂ H ₄) ₂ O	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ N(C ₂ H ₄) ₂ O
PF 1022-233 (238)	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ N(C ₂ H ₄) ₂ O
PF 1022-260 (239)	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ NO ₂	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ NO ₂
PF 1022-268 (240)	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ NO ₂
PF 1022-269 (241)	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₄ NH ₂

Die Erzeugung neuer PF 1022-homologer Substanzen (Tabelle 5) stützt sich bislang auf die chemische Totalsynthese oder der Derivatisierung von fermentativ gewonnenen PF 1022A (**229**). Als Beispiel sei hier die zweifach morpholinsubstituierte Verbindung PF 1022-221 (**237**) erwähnt, welche in wenigen Schritten aus dem Naturstoff (PF 1022A) zugänglich ist (Abbildung 54).

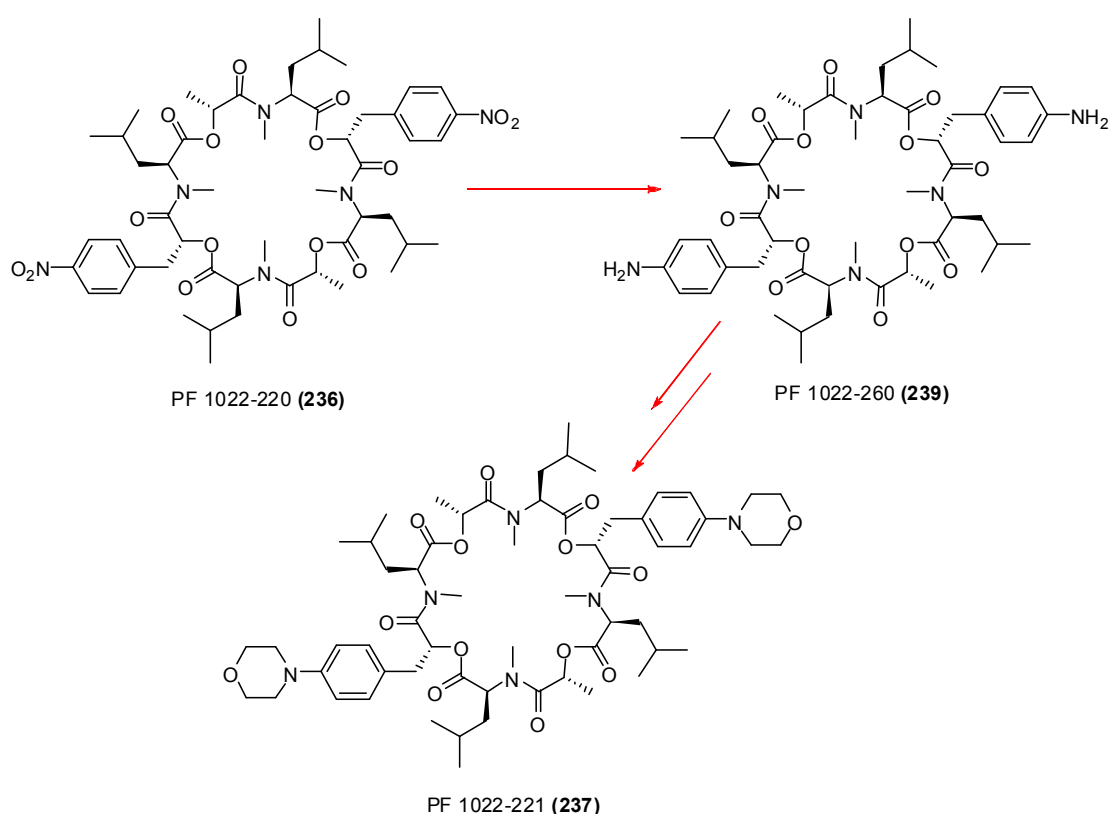


Abbildung 54: Vorstufen (**236**) und (**239**) für die semisynthetische Darstellung des potentiellen pharmazeutischen Wirkstoffs PF 1022-221 (**237**).

2.7.5.1 Physiologische Eigenschaften von PF 1022

Von der Bayer AG durchgeführte veterinärmedizinische Studien mit chemisch modifizierten Homologen zeigten, dass von allen untersuchten Cyclooctadepsipeptiden das PF 1022A (**229**) die stärkste anthelmintische Aktivität aufwies. Ein Austausch der Aminosäure L-Leucin gegen L-Isoleucin reduzierte das Potential der Verbindung um 35% des ursprünglichen Werts. Weitere Versuche zeigten sogar, dass die Derivate welche mit den Aminosäuren L-Valin und L-Phenylalanin supplementiert wurden völlig unwirksam sind. Auch Variationen der *N*-Alkylierung führten zu einer Verringerung des anthelmintischen Potentials.

Zum Beispiel besitzt ein nur dreifach *N*-methyliertes Produkt nur noch 70% der Aktivität von PF 1022A. Untersuchungen an Larven von *Angiostrongylus costaricensis* in Mäusen belegen, dass PF 1022A (**229**) leicht resorbiert wird, und für eine parenterale Applikation eignet.^[321] Die antiparasitäre Wirkung des PF 1022A beruht auf einem neuropharmakologischen Mechanismus, der eine nahezu ideale Kombination zweier erwünschter Effekte darstellt.^[322] PF 1022A zeichnet sich durch seine starke GABA-antagonistische Wirkung aus, während es auch noch gleichzeitig als Acetylcholin-Antagonist fungiert, wobei es an cholinergen Synapsen die Acetylcholinausschüttung irreversibel hemmt.^[323] Ob auch ein postsynaptischer Einfluss vorliegt, konnte bisher nicht eindeutig bewiesen werden. Infolge dessen wird an den GABA-Synapsen die Freisetzung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt massiv stimuliert, wobei wahrscheinlich simultan die Bindung von GABA an die postsynaptischen Rezeptoren erfolgt. Eine Beeinflussung der cholinergen Nerven wurde bereits für das Bassianolid nachgewiesen, indem es die humorale kontraktions-induzierende Wirkungen aufhebt, wie z.B. deren von Histamin oder Prostaglandin E₂.^[303] Durch Synthesen von Tritium-markierten PF 1022 A konnte Pleiß *et al.* den zu Rezeptor-Bindungs-Studien ebnen.^[323] Es konnte gezeigt werden, dass eine Bindungsspezifität in Bezug auf eine Membranproteinfraktion aus *Ascaris sum* vorliegt. Außerdem gelang mittels radioaktiv markierten PF 1022 A der Nachweis, dass die Stereochemie und die dadurch festgelegte Konformation des PF 1022-Moleküls von entscheidender Bedeutung für die anthelmintischen Wirkung ist. Synthetische Diastereomere wiesen im *in vitro*-Assay eine drastische Reduzierung der Aktivität auf. Entsprechende Experimente wurden ebenfalls mit [³H]-markierten Enniatinen durchgeführt.^[324] Weitere mit diesem Thema verwandte Arbeiten, insbesondere die Suche nach Depsipeptid-Rezeptoren in Nematoden und der Wirkungsmechanismus der anthelmintischen Cyclopeptide Enniatin und PF 1022, werden derzeit durchgeführt. Über eine inhibitorische Wirkung der zyklischen Depsipeptide auf die Acyl-Coenzym A-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) wurde berichtet.^[303] ACAT ist ein membrangebundenes Enzym aus Microsomen der Leber, sorgt für die Veresterung von Cholesterin zu Fettsäurecholesterylestern und spielt daher eine entscheidende Rolle bei der intestinalen Resorption des Cholesterins. In dieser Hinsicht kommt dem Beauvericin,

welches sich durch eine besonders hohe Aktivität als ACAT-Hemmstoff auszeichnet, besondere Bedeutung zu; eine mögliche Anwendung als Arzneistoff gegen Hypercholesterinämie und zur Vorbeugung gegen Arteriosklerose wird in Erwägung gezogen. Für die erwähnte Inhibition der ACAT scheint der aromatische Rest von besonderer Bedeutung zu sein, da keines der untersuchten Enniatine eine dem Beauvericin vergleichbare Wirkung erzielten. Ob die verschiedenen biologischen Wirkungen der Cyclodepsipeptide durch ihre Aktivität als Ionophore hervorgerufen werden, konnte bisher nicht bestätigt werden; es ist jedoch wahrscheinlich, dass kein Zusammenhang besteht.^[302,303]

2.7.6 Konzept der „Vorläufer-gerichteten Biosynthese“

Das bereits erwähnte Konzept der Vorläufer-gerichteten Biosynthese^[273,325,326] („precursor-directed biosynthesis“) beruht auf der Einfütterung von Substraten in Submerskulturen, die infolge ihrer chemischen Verwandtschaft zu den natürlichen Substraten ebenfalls von dem produzierenden Organismus bzw. der daraus isolierten Synthetasen (Abbildung 55) verarbeitet werden können, wobei eine Vielzahl an modifizierten Produkten entstehen.

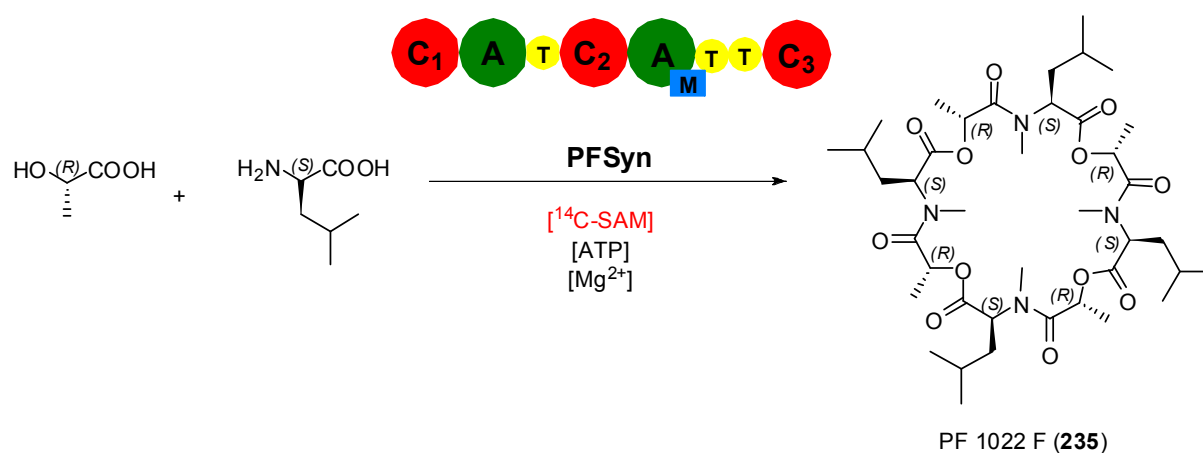


Abbildung 55: Beispiel einer chemoenzymatischen Synthese. *In vitro* Synthese von PF 1022 F mittels PFSyn.^[274]

So wurde beispielsweise gezeigt, dass es sowohl *in vivo* als auch *in vitro* möglich war Enniatine darzustellen die statt D-Hydroxyisovaleriansäure D-Lactat enthielten.^[327,328] Auch im Falle der Cyclosporin-Synthetase (CySyn) konnten durch den Substrataustausch *in vitro* zahlreiche neue Cyclosporine synthetisiert werden.^[329]

3 Aufgabenstellung

Zahlreiche irreversible Inhibitoren tragen als pharmakophore Gruppe einen kleinen elektrophilen Ring. Abgeleitet wurden die meisten dieser Substanzen von E-64 (**25**), einem *trans*-Epoxy succinylpeptid, das von Hanada *et al.* 1978 aus dem Knollenpilz *Aspergillus japonicus* isoliert wurde^[152-154] und der Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Vielzahl synthetischer Cysteinprotease-Inhibitoren wie z.B. E-64c^[153,174] (**28**) und CA-028^[162-164] (**34**) war. Aufgrund der interessanten pharmakologischen Eigenschaften stellt dieser Naturstoff (E-64, **25**) eine optimale Leitstruktur für die Entwicklung neuer Inhibitoren der papainähnlichen Cysteinproteasen dar.^[191,194,196-198] Der Zugang zu ausreichenden Wirkstoffmengen für biologische oder klinische Tests aus den natürlichen Ressourcen ist jedoch meist überaus schwierig. Die chemische Synthese ist daher ein wichtiges Instrument bei der Erforschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe. Oftmals sind es die chemisch veränderten Analoga eines ursprünglichen Naturstoffes, die sich als wirksamere oder besser applizierbare Substanzen erweisen. Die Herausforderung für den präparativen Chemiker ist somit die Entwicklung geeigneter Totalsynthesen des Naturstoffes als auch die Optimierung der Leitstruktur und davon ableitbaren Strukturen.

Während auf dem Gebiet der Cysteinproteaseinhibitoren bereits zahlreiche synthetische Arbeiten bzw. Modellstudien zu den Leitstrukturen E-64^[152-154] (**25**) und CA-074^[164,165] (**33**) publiziert wurden, und diese auch hinsichtlich Ihrer selektiven Adressierung der Enzym-bindungstaschen S3, S2, und S2' optimiert wurden,^[170,178,190,194] stehen synthetische Arbeiten zur spezifischen Adressierung der S1- und S1'-Bindungstaschen und deren Screening an papainähnlichen Cysteinproteasen aus. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese einer E64c- und CA028-ähnlichen (-like) Peptidbibliothek mit trisubstituierten elektrophilen Bausteinen („Warheads“, s. Abbildung 56) als potentielle irreversible Inhibitoren der papainähnlichen Cysteinproteasen und deren Testung an Cathepsin B, Cathepsin L sowie *Papain latex* und *Papain carica*. Wegen der unterschiedlichen Substratspezifitäten innerhalb der Familie der papainähnlichen Cysteinproteasen in P1 und P1' sollte eine Auswahl von „Warheads“ mit unterschiedlichem Substitutionsmuster zur Adressierung der S1- und S1'-Bindungstaschen synthetisiert werden (Abbildung 56). Durch Kupplung der bekannten E64c- (**242**) oder CA028-ähnlichen (**243**) Dipeptideinheiten mit den elektrophilen „Warheads“ (**244 – 251**) sollen E64c- oder CA028-ähnliche Tripeptide synthetisiert werden, welche sich hauptsächlich anhand ihrer Substituenten an C-2 oder C-3 des Warheads unterscheiden. Mittels der dargestellten Inhibitorbibliothek soll der Einfluss der unterschiedlichen Substituenten in P1 oder P1' hinsichtlich der Hemmwirkung, Hemmstärke

als auch der Selektivität innerhalb der papainähnlichen Cysteinproteasen untersucht werden. Während der Darstellung der elektrophilen Bausteine führte die Synthese über ein 2,3-Diol als Zwischenprodukt. Aufgrund der literaturbeschriebenen reversiblen Inhibierung von Aspartylproteasen infolge von Diolen, wollte man eine mögliche Inhibierung von Cysteinproteasen durch den Einsatz von 2,3-Diolen (**246**, **247**, **250**, **251**) als „Warheads“ untersuchen. Es wurden verschiedene Ansätze bearbeitet, über die Einblicke in die Wechselwirkung der Inhibitoren mit den Zielproteinen gewonnen werden sollten. Als reaktive elektrophile Bausteine sollten *trans*-konfigurierte Epoxide (**245**, **249**), sowie (*E*)-konfigurierte Olefine (**244**, **248**) dienen, als auch die schon erwähnten 2,3-Diole (Abbildung 56). Zum einen sollte geklärt werden, ob trisubstituierte *trans*-Epoxide bzw. (*Z*)- und (*E*)-Olefine die selektive Inhibierung innerhalb der papainähnlichen Cysteinproteasen durch Adressierung der S1- oder S1'-Bindungstasche aufgrund der Substitution an C2 oder C3 des elektrophilen Bausteins begünstigen (Abbildung 56; **28** und **34**).

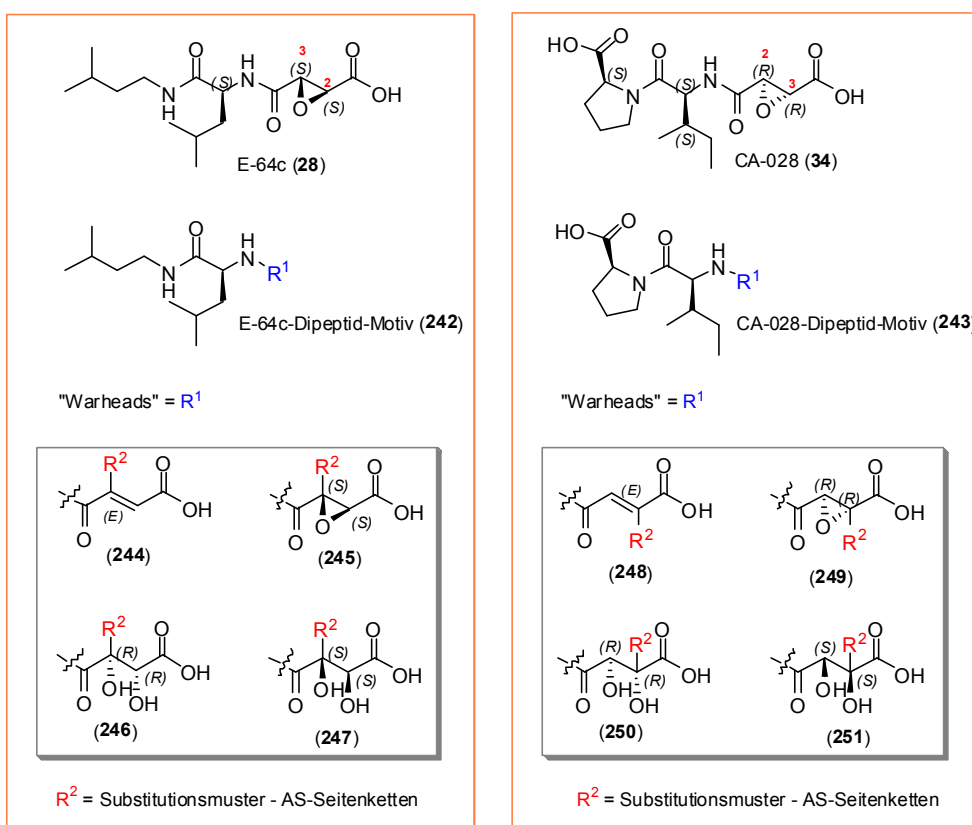


Abbildung 56: Leitstruktur E-64c (**28**) und CA-028 (**34**) an denen sich der Aufbau der Inhibitorbibliothek orientieren soll. Für die Synthese der Dipeptidfragmente wurde daher das E-64c-Motiv (**242**), und CA-028-Motiv (**243**) gewählt. Ziel ist es die Dipeptideinheiten (**242**, **243**) mit einem breiten Spektrum unterschiedlich substituierter „Warheads“ (**244** – **251**) zu koppeln und dadurch eine kombinatorische Inhibitor-Bibliothek aufzubauen.

Mit den *E*-Olefinen sollte eine Antwort gefunden werden, inwiefern auch stark elektronenarme Michael-Systeme zur irreversiblen Hemmung von Cysteinproteasen dienen können. Außerdem sollte geklärt werden ob die *E*-Konfiguration der Olefine ebenso wichtig ist wie die *trans*-Konfiguration bei den Epoxiden. Mit dem Einsatz der 2,3-Diole (**246**, **247**, **250**, **251**) sollte das Potential einer reversiblen Inhibierung (Pseudosubstrat) der papainähnlichen Cysteinproteasen untersucht werden. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die Darstellung der trisubstituierten Olefine (**244**, **248**), als auch deren Umsetzung zu den 2,3-Diolen und Epoxiden (**245**, **249**). Die Kupplung der „Warheads“ mit den Dipeptid-Motiven (**242**, **243**), als auch die Synthese der Dipeptide soll in flüssiger Phase erfolgen. Hierbei war es essentiell ein geeignetes Kupplungsprotokoll zu etablieren, welches eine Racemisierung an C $_{\alpha}$ -Atomen von epimerisierungsempfindlichen Bausteinen verhindert. Durch Bestimmung der IC $_{50}$ -Werte in einem vorausgehenden Screening-Verfahren sollten die jeweiligen interessanten Mitglieder (Inhibierung > 50%) der Inhibitor-Bibliothek ermittelt werden. Danach sollte in einem weiteren Zyklus durch Bestimmung der Inhibitionskonstanten die Art der Inhibierung (reversibel; irreversibel) als auch das inhibitorische Potential der Verbindungen bestimmt werden. Abschließend sollten die synthetischen Intermediate zusammen mit den Tripeptiden in SAR-Studien hinsichtlich einer antibakteriellen Wirkung untersucht werden.

Veröffentlichungen über die Cyclodepsipeptide Enniatin und PF 1022 beschreiben bislang deren Gewinnung mittels Fermentation,^[283-285] „precursor-directed biosynthesis“,^[328] Total-synthesen^[330,331] sowie die Strukturaufklärung der Verbindungen. Umfangreiche chemo-enzymatische Arbeiten auf dem Gebiet der Cyclodepsipeptide sind so gut wie keine bekannt.

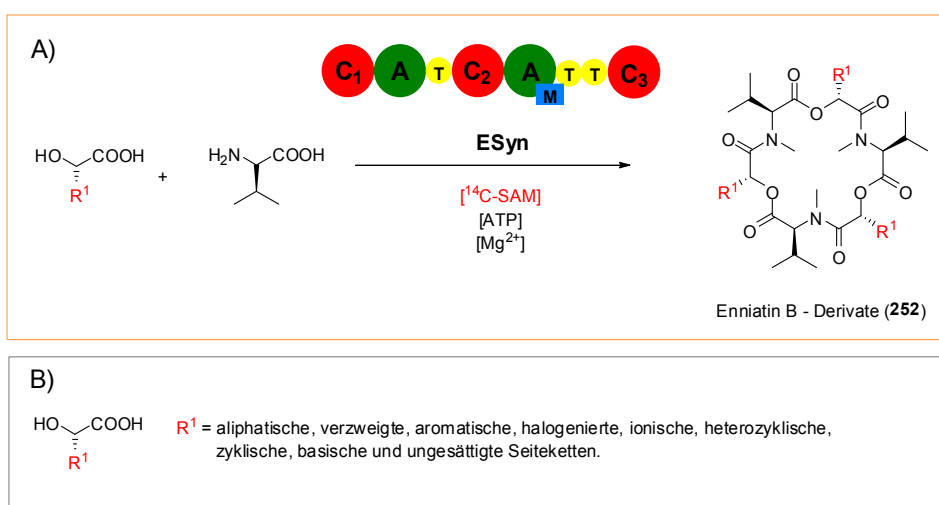


Abbildung 57a: A) Versuchsaufbau der chemoenzymatischen Synthese neuer Enniatin-Derivate (**252**); B) Synthetische Bibliothek unterschiedlichster α -D-Hydroxysäuren für die *in vitro*-Synthese.

Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Synthese einer α -D-Hydroxysäuren-Bibliothek (Abbildung 57a) zur Verwendung in der chemoenzymatischen Darstellung neuer Hexa-, und Octa-Cyclodepsipeptide vom Enniatin- (**252**) oder PF 1022-Typ (**253**).

Die wenigen der bisher durchgeführten chemoenzymatischen Ansätze zur Generierung neuer Cyclodepsipeptide beruhen hauptsächlich (bis auf wenige D-Hydroxysäuren) auf der Zufütterung unterschiedlicher L-Aminosäuren wie z.B. Leu, Ile, Val, Phe, Ala.^[302,328] Die Ursache für die geringe Diversität liegt in der hohen Substratspezifität der Aminosäurenbindungstasche, und in der Nichtverfügbarkeit alternativer Hydroxysäuren sowohl für ESyn, als auch für die PFSyn begründet. Mittels der synthetisierten α -D-Hydroxysäuren-Bibliothek (ca. 60) soll die Substratspezifität der D-Hydroxysäuren-Bindungstasche von ESyn und PFSyn untersucht werden. Desweiteren soll durch den chemoenzymatischen Ansatz ein breites Spektrum neuer nicht literaturbekannter Cyclodepsipeptide dargestellt werden (Abbildung 57), um diese hinsichtlich möglicher veränderten pharmakologischen Eigenschaften zu untersuchen. Für die Darstellung der Hydroxysäurenbibliothek sollte eine generelle Methode etabliert werden, mit der es möglich ist eine große Diversität an enantiomerenreinen α -D-Hydroxysäuren zu synthetisieren. Bei der Wahl der Syntheseroute muss besonders darauf geachtet werden, dass die Synthese ein breites Spektrum an unterschiedlichsten Funktionalitäten toleriert. Zudem muss die Löslichkeit von Intermediaten in den für Aufarbeitungsprozeduren und Reaktionen gebräuchlichen Lösungsmitteln gewährleistet bleiben.

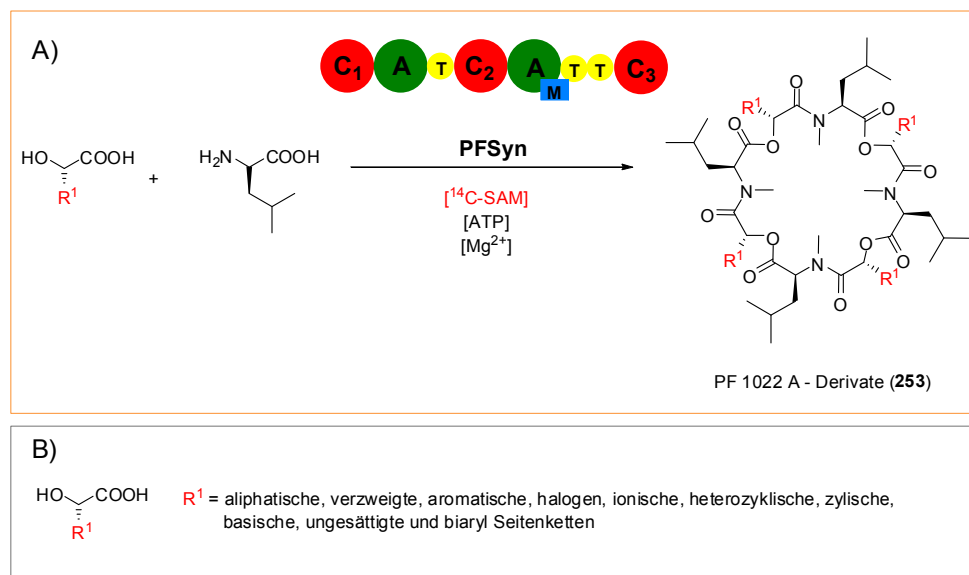
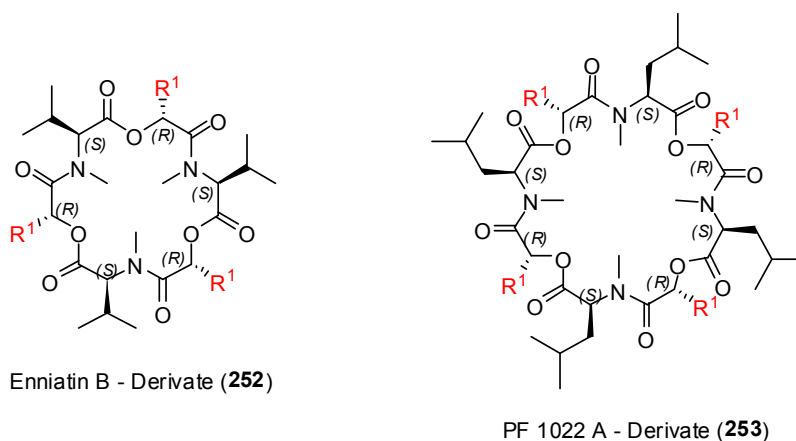


Abbildung 57b: A) Versuchsaufbau der chemoenzymatischen Synthese neuer PF 1022 A Derivate (**253**); B) Synthetische Bibliothek unterschiedlichster aliphatischer und aromatischer α -D-Hydroxysäuren für die *in vitro*-Synthese.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese einer α -D-Hydroxysäurenbibliothek für die chemoenzymatische Synthese neuer Cyclodepsipeptide

Abschnitte 2.7.4, 2.7.5 und 2.7.6 dieser Arbeit beschreiben die bislang veröffentlichten *in vitro*-synthetischen Arbeiten auf dem Gebiet der Enniatine-^[326] und PF 1022-Derivate^[325] und machen deutlich, dass diese Verbindungsklasse im Blickpunkt aktueller Forschung steht. So vielfältig die pharmakologischen Eigenschaften^[311,315-317] sein mögen, steht eine genauere Untersuchung der Wirkmechanismen noch aus. Erkenntnisse zum Wirkmechanismus können Strukturen unterschiedlichster Derivatisierung liefern, die in kurzer Zeit mit angemessenem Arbeitsaufwand in ausreichenden Mengen zugänglich sein müssen. Aufgrund der bekannt hohen Substratspezifität der Aminosäurebindungsstelle der Enniatin- (ESyn)^[287] und PF-Synthetase (PFSyn),^[288] und dem geringen Wissen über die Substrattoleranz der D-Hydroxysäurenbindungsstelle von ESyn und PFSyn, sollte mittels gerichteter Supplementation unterschiedlicher synthetischer α -D-Hydroxysäuren in einem *in vitro*-Assay die Substratspezifität der Hydroxysäurenbindungsstellen, sowie das Spektrum an möglichen Enniatin B- (**252**) und PF 1022 A-Derivaten (**253**) näher untersucht werden (Abbildung 58).



R^1 = aliphatische, aromatische, halogenierte, ionische, heterozyklische, zyklische und ungesättigte Seitenketten.

Abbildung 58: Grundstrukturen der Cyclodepsipeptide des Enniatin B- (**252**) und PF 1022A-Typs (**253**). Die synthetisch dargestellten α -D-Hydroxysäuren bilden die Grundlage für den Aufbau einer chemoenzymatischen Bibliothek neuer Cyclodepsipeptide.

Ein schneller Zugang zu einer großen Zahl strukturell verschiedener α -D-Hydroxysäuren (**257**) sollte über die direkt enantioselektive Diazotierung nach Brewster *et al.* erfolgen.^[332-334] Zahlreiche Syntheseprotokolle sind auf diesem Gebiet bislang etabliert worden.^[211] Der Einsatz ungewöhnlicher, razemisierungsempfindlicher nicht-proteinogener Aminosäuren als Substrate für die verwendete Methode stellt jedoch immer noch eine Herausforderung dar. Für die Diazotierung in 0.5 M schwefelsaurer Lösung war es wichtig die richtigen Schutzgruppen als auch milde Entschützungsbedingungen für die polaren, sauren oder basischen Seitenkettenfunktionalitäten zu wählen. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren und in Anlehnung an die publizierten Arbeiten sollte ein geeignetes Syntheseprotokoll entwickelt werden, welches den schnellen Zugang zu einer Vielzahl von α -D-Hydroxysäuren-Derivaten ermöglichen sollte. Das synthetische Konzept hierfür ist in Abbildung 59 gezeigt.

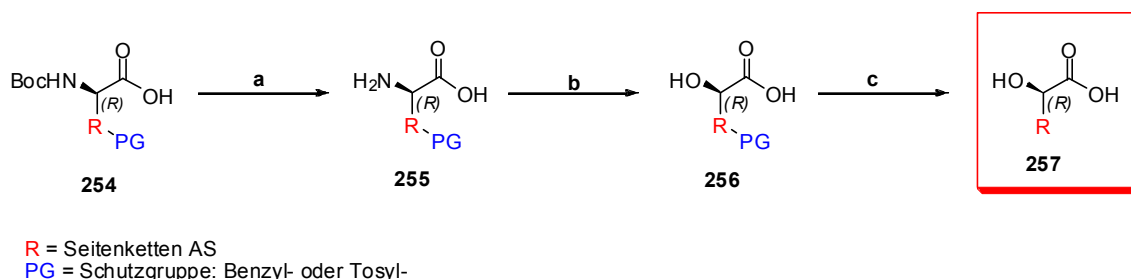
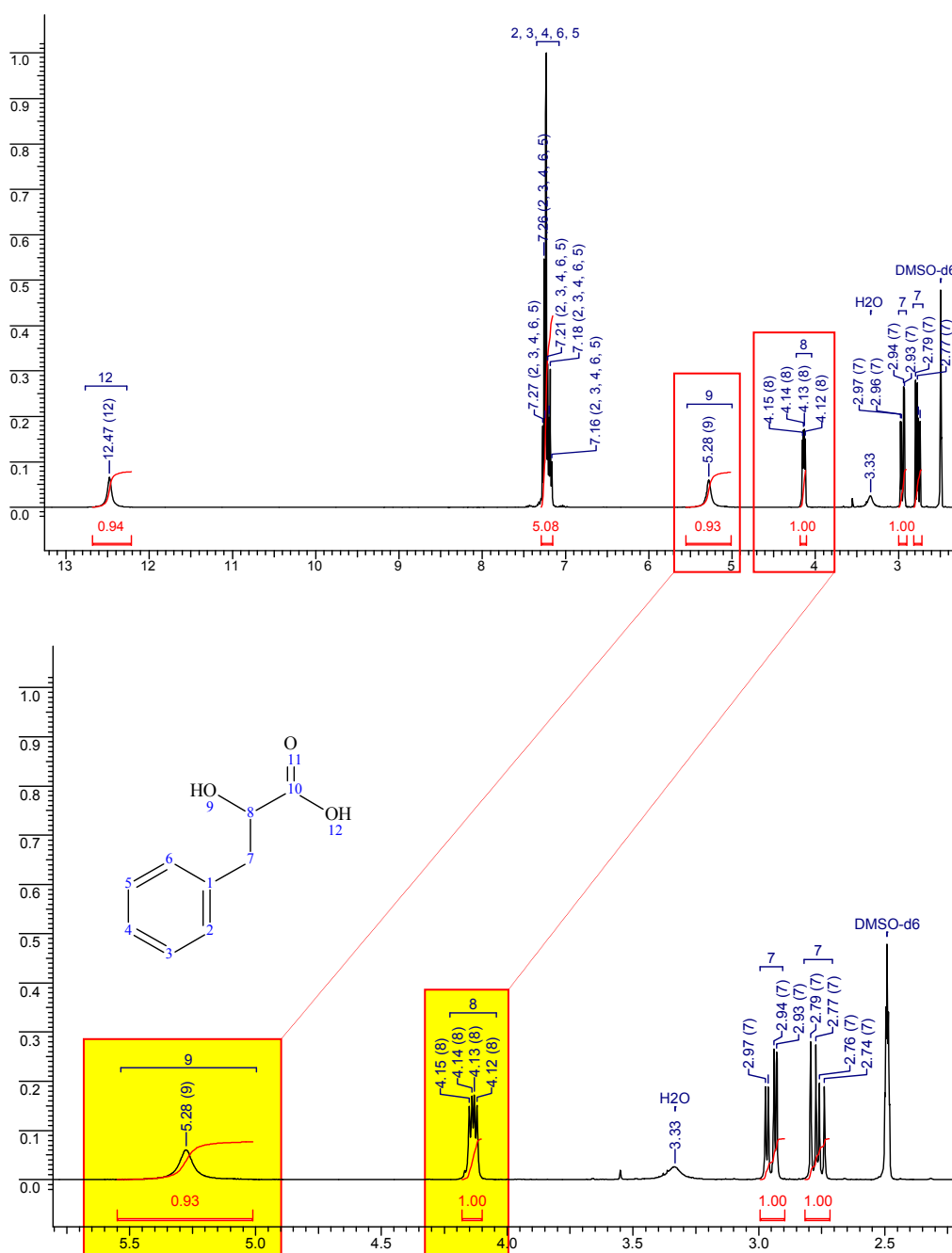


Abbildung 59: Allgemeine Synthesestrategie zur Darstellung von enantiomerenreinen α -D-Hydroxysäuren **257**: a) TFA, DCM, TIPS, RT, 1 h, quantitativ; b) NaNO_2 , H_2SO_4 , H_2O , 0 °C \rightarrow RT, 24 h, 50-98%; c) MeOH, Pd/C (10%), H_2 , RT, 6 h, quantitativ (PG = Benzylester oder Benzylether); oder PhMe_2SiLi , 0 °C, THF, 3 h, 78% (PG = Tosylentschützung).

Die dargestellten α -D-Hydroxysäuren (**258-307**) waren alle aus kommerziell erhältlichen proteinogenen und nicht-proteinogenen α -D-Aminosäuren (**254**) über maximal drei Stufen zugänglich (Abbildung 59). Zunächst erfolgte die Entschützung der Boc-geschützten Aminofunktion mittels TFA in DCM in Gegenwart von Triisopropylsilan (als Scavenger)^[335] über einen Zeitraum von 1 Stunde mit quantitativer Umsetzung bei den meisten Substraten zu **255**. DC-Kontrollen zeigten eine fast vollständige Umsetzung bereits nach 45 Minuten, jedoch wurde die Reaktionszeit auf 1 Stunde ausgedehnt um eine quantitative Umsetzung zu gewährleisten. Folgend wurde die überschüssige TFA azeotrop entfernt und das Produkt konnte ohne weitere Aufreinigungsschritte der nächsten Stufe zugeführt werden. Der darauffolgende Schlüsselschritt, die enantioselektive Diazotierung erfolgt mittels langsamer Zugabe von NaNO_2 in H_2O (Spritzenpumpe, 2.0 ml/h) zu der 0.5 M schwefelsauren Reaktionslösung bei 0 °C unter starkem Rühren. Eine langsame Zugabe der Natriumnitrit-Lösung ist essentiell für das Erreichen einer guten Ausbeute, oder bei komplexeren Substraten entscheidend für das Gelingen der Reaktion. Nach erfolgter Zugabe der

Natriumnitrit-Lösung lässt man die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur kommen und rührt für weitere 24 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Umkristallisation, die sich bei einigen Substraten, schwierig gestaltete und es daher zu großen Schwankungen in der Ausbeute kam, 50-95%. Der letzte Schritt, die Entschützung der Benzylester,- oder -ether geschützten Seitenkettenfunktionalitäten erfolgte nach einem publizierten Standard-Protokoll mittels Pd/C (10%) in MeOH unter H₂-Atmosphäre bei Raumtemperatur für 6 Stunden in nahezu quantitativer Umsetzung. Auch die Abspaltung der Tosylschutzgruppe mit Phenyl-dimethylsilyllithium in THF, konnte nach einer bereits Publizierten Vorschrift mit Ausbeuten von 69-78% durchgeführt werden^[336] Die synthetisierten α -D-Hydroxysäuren konnten durch zweifache Umkristallisation in ausreichender Reinheit dargestellt werden.



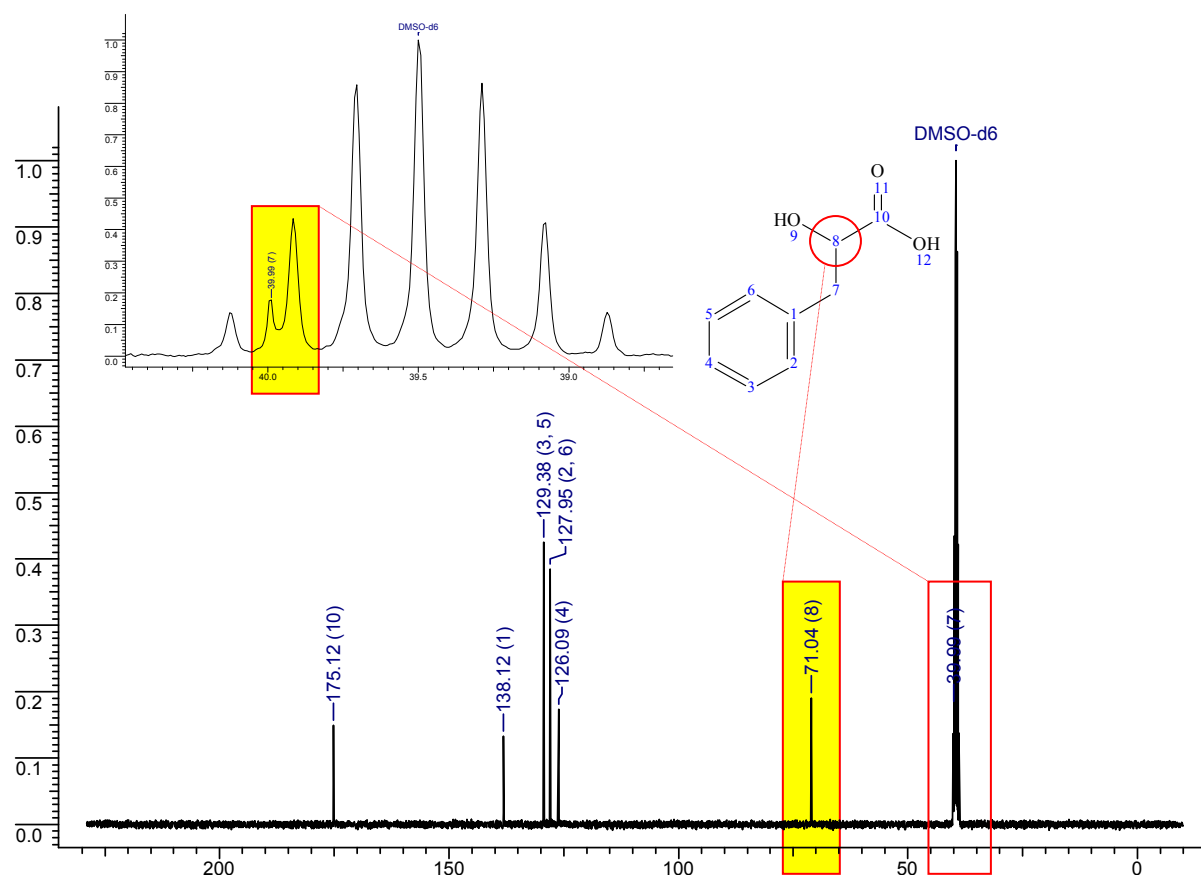


Abbildung 60: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von α-D-2-Hydroxy-3-phenyl-propionsäure (**291**) nach erfolgter Umkristallisation in DMSO-d₆. Das wichtige Signal im ¹H-NMR-Spektrum stellt das am stereozentrumgebundene Wasserstoff bei 4.13 ppm dar. Durch Einführung der Hydroxyfunktion kommt es zu einer Hochfeldverschiebung des C_α-substituierten Wasserstoffs. Eine Hochfeldverschiebung beobachtet man auch im ¹³C-NMR-Spektrum, wobei sich hier die Signale für das C_α-Atom und die benachbarte Methylen-Gruppe verschieben (71.0 ppm bzw. 40.0 ppm). Die erhaltenen Verbindungen waren ohne säulenchromatographische Aufreinigung bereits ausreichend rein.

Eine zusätzliche säulenchromatographische Aufreinigung, wie anhand der exemplarischen ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren zu sehen ist, war nicht weiter notwendig (s. Abbildung 60). Aufgrund des umfangreichen Spektrums an synthetisierten α-D-Hydroxysäuren, ist es leider nicht möglich alle Spektren in diesem Abschnitt aufzuführen. Auf die einzelnen Schwierigkeiten bzw. notwendigen Abweichungen vom Standard-Protokoll, sowie das Spektrum der synthetisierten α-D-Hydroxysäuren soll in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden.

4.1.1 Darstellung der aliphatischen α -D-Hydroxysäuren

Bei der Synthese der unverzweigten aliphatischen Hydroxysäuren **258**, **259**, **260**, **261**, **262**, und der ungesättigten Verbindungen **269** und **270** war eine Abweichung vom Standard-Protokoll nicht notwendig, da einzelne dieser Hydroxysäuren auch schon über die beschriebene Methode dargestellt wurden. Die Aufarbeitung von D-Lactat (**258**) erwies sich aber aufgrund der kleinen Molekülstruktur und des Überwiegens der polaren Gruppen (**258**) als schwierig. Dabei gestaltete sich die Extraktion mittels Ethylacetat aus der wässrigen Reaktionslösung als sehr aufwendig und lieferte eine unzureichende Ausbeute von nur 52%. Eine Umkristallisation war bei D-Lactat (**258**) auch nur bedingt erfolgreich, da nach mehrmaliger Umkristallisation hauptsächlich ein Öl als Produkt zurück blieb. Mit zunehmender Kettenlänge der Verbindungen **260**, **261**, **262** kam es zu einer sukzessiven Abnahme der Ausbeute, die durch das Auftreten von sterischen Einflüssen durch die Alkylkette begründet werden (*product-development control*). Die Darstellung der verzweigten Hydroxysäuren **263**, **264**, **265**, **266**, **267** und **268** gestaltete sich problemlos und lieferte wie auch schon für die restlichen aliphatischen Hydroxysäuren Ausbeuten von 70-90%. Prinzipiell kann mit der angewendeten Methode eine Vielzahl aliphatischer Hydroxysäuren dargestellt werden.

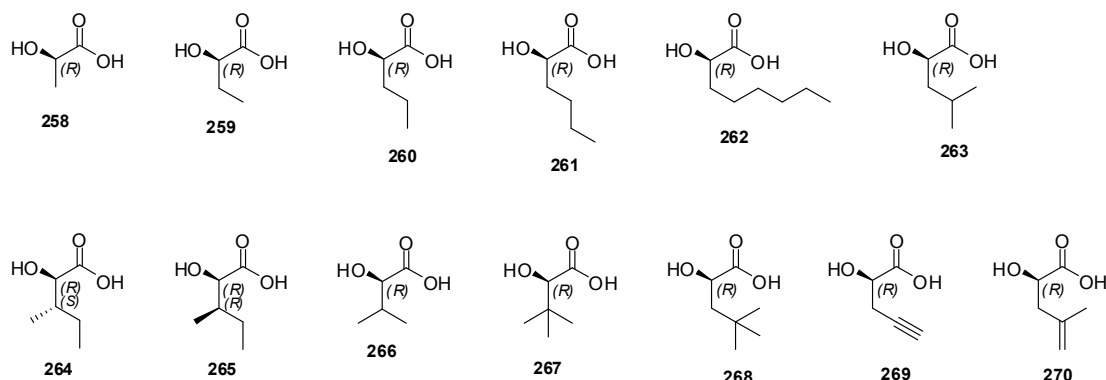


Abbildung 61: Synthetisch dargestellte aliphatische, unverzweigte (**258**, **259**, **260**, **261**, **262**), verzweigte (**264**, **265**, **266**, **267**, **268**) und ungesättigte (**269**, **270**) α -D-Hydroxysäuren.

Eine mögliche Problematik bei längeren Alkylketten bzw. sterischen Hinderungen ist die Tatsache, dass aliphatische Diazoniumsalze um ein Vielfaches instabiler als ihre aromatischen Analoga sind, die ihrerseits leicht zum Zerfall neigen. Aliphatische Diazoniumsalze sind erstens nicht resonanzstabilisiert, und zweitens spalten sie viel schneller N_2 ab als ihre aromatischen Analoga und reagieren so zu relativ stabilen Alkyl-Kationen. Der Zerfall von aliphatischen Diazoniumsalzen wird also durch product-

development control begünstigt. Aus aromatischen Diazoniumsalzen entstehen dagegen Phenyl-Kationen. Diese sind noch weniger stabil als Alkenyl-Kationen. Molekularer Stickstoff stellt in aliphatischen Diazoniumsalzen eine exzellente Abgangsgruppe dar. N_2 wird aus diesen Salzen sogar so schnell abgespalten, dass ein externes Nucleophil keine Chance hat, ihn aktiv durch einen Rückseitenangriff zu verdrängen. Nur ein „internes Nucleophil“ (Nachbargruppe) kann dies rasch genug tun. Aus aliphatischen Diazoniumsalzen ohne geeignete Nachbargruppe entstehen daher immer Carbenium-Ionen. Carbenium-Ionen gehen oft eine Vielzahl von Folgereaktionen ein und liefern dadurch oft unerwünschte Produktgemische. Wird also der Nachbargruppeneffekt in unserem Fall die Carboxylfunktion durch einen zu großen sterischen Anspruch der Substituent negativ beeinflusst, kann es partiell zu einem nicht resonanzstabilisierten Diazoniumsalz kommen welches zu einem schnellen Zerfall neigt und unerwünschte Nebenreaktionen eingeht.

4.1.2 Darstellung der halogenierten und polaren α -D-Hydroxysäuren

Die Darstellung der β -halogenierten α -D-Hydroxysäuren **271**, **272**, **273** (Abbildung 63) verlief problemlos, wobei die Flussrate der $NaNO_2$ -Lösung auf 1.0 ml/h reduziert wurde, sowie die Reaktionszeit bei 0 °C auf 5 h ausgedehnt wurde. Bei der Diazotierung der β -fluorierten Verbindung **271** sank die Ausbeute auf 49% ab, was auf eine partielle Zersetzung (Instabilität der fluorierten Verbindung bei Temperaturen über -10 °C) als auch die erschwerte Extraktion (siehe D-Lactat, **258**) zurückgeführt wird. Für die β -Chlor- **272**, und β -Brom-Verbindungen **273** konnten zufriedenstellende Ausbeuten von 63% und 62% erzielt werden. Die seitenkettengeschützten Bausteine **276**, **277** und **278** konnten in sehr guten Ausbeuten von 92%, 92% bzw. 89% dargestellt werden.

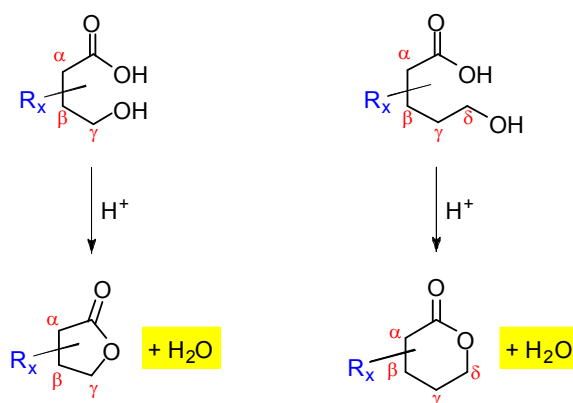


Abbildung 62: Beispiel der spontanen Lactonisierung von γ - und δ -Hydroxycarbonsäuren nach dem A_{AC2} -Mechanismus.

Ein Problem bei der Darstellung der Verbindung **278** bzw. **280** ist die Lactonbildung von Hydroxycarbonsäuren. Die γ - und δ -Hydroxycarbonsäuren verestern schon in Anwesenheit katalytischer Mengen Säure sehr leicht intramolekular; wodurch sie in fünfgliedrige γ -Lactone bzw. sechsgliedrige δ -Lactone übergehen (Abbildung 62). Diese Lactonisierung erfolgt oft so leicht, dass sie nicht vermieden werden können. Der Carbonsäureanteil des Substrats bewirkt dann schon durch seine eigene Acidität die saure Katalyse. Die hohe Geschwindigkeit der Lactonisierung ist eine Folge der geringeren Aktivierungsentropie, von der intramolekularen Reaktion, die über drei-, fünf-, oder sechsgliedrige Übergangszustände ablaufen, stets profitieren. Die hohe Lactonisierungstendenz beruht auf der Zunahme der Entropie, von der intermolekularen Veresterungen nicht profitieren. Die intramolekulare Lactonisierung konnte bei der Hydroxysäure **278** bzw. **280** nur in geringem Umfang beobachtet werden. Die darauffolgende Entschützung der Seitenketten von **277** und **278** mit Pd/C (10%) in Methanol unter H_2 -Atmosphäre lieferte die erwarteten quantitativen Ausbeuten für die verwendete Methode.

Bei den Thio-Derivaten **274** und **275** kam es zu keinen unvorhergesehen Schwierigkeiten während der Umsetzung, da eine mögliche Oxidation der Hydroxysäure **274** und **275** schon erwartet wurde. Das oxidierte Nebenprodukt konnte nach mehrmaliger Umkristallisation erfolgreich abgetrennt werden. Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Derivate **274**, **275** wurde nicht in Betracht gezogen, da die erzielten Ausbeuten von 57% (**274**) und 59% (**275**) und die daraus resultierenden Mengen (500 mg – 800 mg) an Substanz für eine Anwendung im *in vitro*-Assay ausreichend waren.

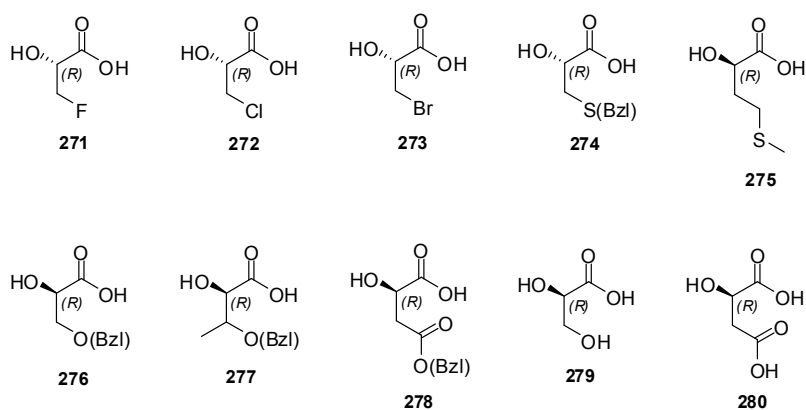


Abbildung 63: Synthetisch dargestellte β -halogenierte-, (**271**, **272**, **273**), Thio-, (**274**, **275**) bzw. polare- (**276**, **277**, **278**, **279**, **280**) D-Hydroxysäuren.

Zusammenfassend kann ausgehend von dieser Methode unter geringfügigen Modifikationen des Syntheseprotokolls ein breites Spektrum von seitenkettenfunktionalisierten α -D-Hydroxysäuren dargestellt werden. Wichtig ist die bedachte Wahl der Schutzgruppenstrategie oder

gar die postsynthetische Einführung der eigentlichen Funktionalität. Wobei eine Umsetzung stark säureempfindlicher Verbindungen über diesen Weg nur schwer zu realisieren sein dürfte.

4.1.3 Darstellung der α,α -quartär substituierten Hydroxysäuren

Bisher gibt es keine Veröffentlichungen zur Diazotierung von quartär substituierten α,α -Aminosäuren. Daher war es besonders spannend, ob es aufgrund sterischer Hinderung und der dadurch erschwerten Dreiringlactonbildung (s. Theorie Abschnitt 2.4.1) zu einer Umsetzung mit den genannten Verbindungen kommt. Bei den aliphatischen α,α -Hydroxysäuren **281** und **282** zeigte sich, dass eine sukzessive Verlängerung der Alkylkette zu einem Einbruch der Ausbeuten führt, 56% (**281**) und 43% (**282**). Eine Umsetzung von α,α -Dipropyl-, α,α -Dibutyl- oder α,α -Dihexyl-Derivaten war nicht mehr möglich und es konnte keinerlei Produkt isoliert werden. Die Darstellung der α,α -substituierten cyclischen Derivate **283**, **284** und **285** hingegen gestaltete sich problemlos, wobei ein Einfluss der Ringgröße auf die erhaltene Ausbeute beobachtet wurde.

Die weniger stark gespannten fünf- (**284**) bzw. sechsgliedrigen (**285**) Ringe lieferten eine besser Ausbeute als das stark gespannte dreigliedrige Derivat (**283**). Einzig die aromatische Verbindung **286** ließ sich nur schwer synthetisieren. Der hydrophobe Charakter der Verbindung erniedrigte dessen Löslichkeitsprodukt in der 0.5 M schwefelsauren Lösung stark. Diesem Umstand konnte auch mit einem Überschuss an Schwefelsäure nicht beigegeben werden, so dass auf den tropfenweisen Zusatz von THF (Lösungsvermittler) zurückgegriffen wurde bis die Aminosäure vollständig gelöst war. Aufgrund der großen aromatischen α,α -Reste ist der Übergang in ein Dreiringlacton erheblich erschwert (Nachbargruppenbeteiligung der Carboxygruppe) und das Fehlen des internen Nucleophils führt zur Bildung stabiler Phenylkationen welche unerwünschte Nebenreaktionen eingehen. Prinzipiell ließ sich aber auch die aromatische α,α -Hydroxysäure (**286**) mit einer Ausbeute von 39% darstellen.

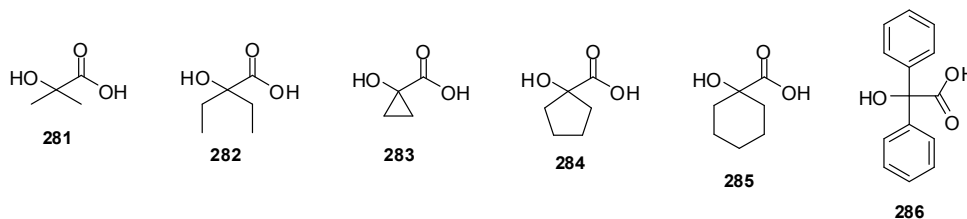


Abbildung 64: Synthetisch dargestellte α,α -substituierte aliphatische (**281**, **282**), cyclische (**283**, **284**, **285**) und aromatische (**286**) Hydroxysäuren.

4.1.4 Darstellung der zyklischen und aromatischen α -D-Hydroxysäuren

Publikationen zur Diazotierung der aromatischen Verbindungen **290** und **291** gibt es mehrere, doch über die Darstellung der Verbindungen **287-289** und dem β,β -Diphenyl- (**293**), Biaryl- (**294**) oder gar Naphtyl-Derivat (**295**) ist bisher nichts publiziert. Für die Charakterisierung (*in vitro*-Assay) der Hydroxysäurenbindungstasche der ESyn als auch der PFSyn war die Synthese dieser Derivate von großer Bedeutung. Die Cyclopropyl- (**287**), sowie Cyclohexyl-Derivate (**288**, **289**) waren über das Standard-Protokoll zugänglich und konnten in ausreichenden Ausbeuten von 82% (**287**), 63% (**288**) und 62% (**289**) dargestellt werden. Die Synthese der aromatischen Verbindungen **290**, **291**, **292** waren mitunter die einfachsten, und konnten in Ausbeuten > 90% synthetisiert werden. Bei den β,β -Diphenyl- (**293**), Biaryl- (**294**) und Naphtyl-Derivat (**295**) gestaltete sich die Umsetzung aufgrund der Hydrophobizität und des sterischen Anspruchs der aromatischen Substituenten dagegen schwer. Ohne Zusatz von THF war es nicht möglich, die oben genannten aromatischen Verbindungen in Lösung zu bringen. Aufgrund der schon früher erwähnten Problematik des notwendigen Nachbargruppen-Effekts und dessen Einschränkung über sterische Hinderung, mag dieser auch für die geringen Ausbeuten der aromatischen Derivate **293**, **294** und **295** verantwortlich sein.

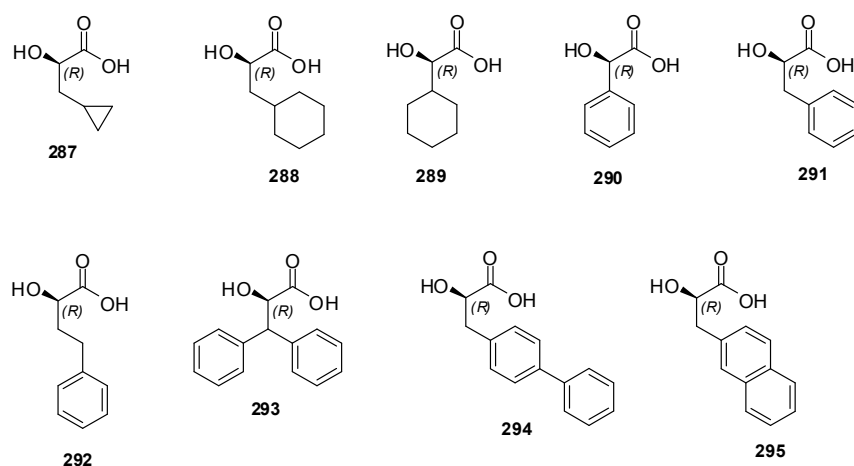


Abbildung 65: Synthetisch dargestellte cyclische (**287**, **288**, **289**), aromatische (**290**, **291**, **292**) und komplexe aromatische (**293**, **294**, **295**) α -D-Hydroxysäuren.

Eine Darstellung dieser Bausteine war indessen aber doch möglich wobei die Ausbeuten für die Derivate **293-295** nicht über 50% lagen. Auf eine Optimierung des Syntheseprotokolls wurde auch hier verzichtet, da die synthetisierten Mengen für den vorgesehenen *in vitro*-Assay ausreichend waren. Für eine Ausdehnung der Synthese komplexer aromatischen Hydroxy-

säuren, muss das Syntheseprotokoll hinsichtlich des verwendeten Lösungsmittel und der Reaktionstemperatur optimiert werden.

4.1.5 Darstellung der heterozyklischen und substituierten aromatischen α -D-Hydroxysäuren

Die in *para*-Position halogenierten α -D-Phenyllactat-Derivate **296**, **297**, **298**, **299**, sowie die Penta-fluor-Verbindung **300** ließen sich alle problemlos darstellen, wobei die Ausbeuten der halogenierten Verbindungen im direkten Vergleich mit D-Phenyllactat **291** stark absanken. Die *p*-Fluor-Verbindung **296** konnte noch in einer Ausbeute von 68% dargestellt werden, wohingegen mit zunehmender Größe der Halogensubstituenten *p*-Chlor- (66%, **297**), *p*-Brom- (56%, **298**), *p*-Iod- (51%, **299**) bishin zur Penta-fluor-Verbindung **300** die erzielten Ausbeuten sukzessive abnahmen. Die Synthese der *p*-Cyano- (**302**) und *p*-Nitro- (**301**)-Verbindungen konnte nach dem Standardprotokoll durchgeführt werden und lieferte Ausbeuten von 54% bzw. 45%.

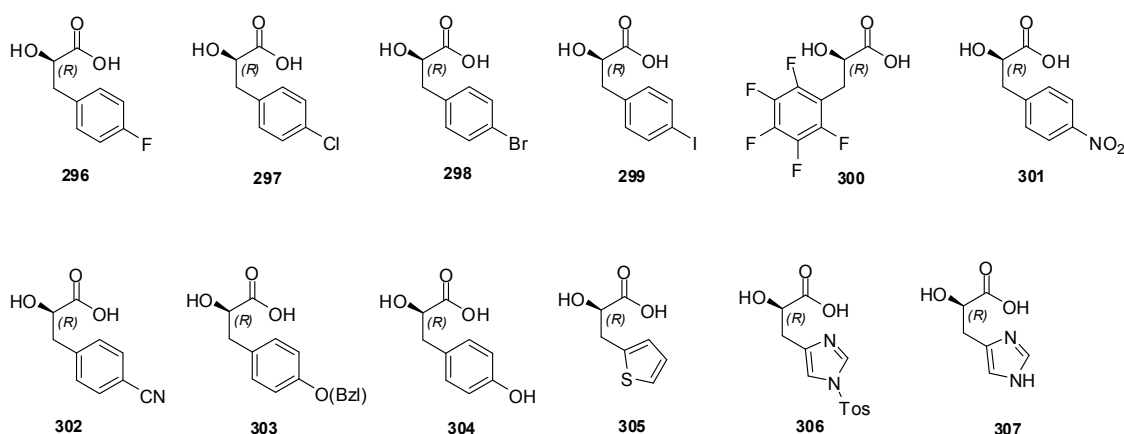


Abbildung 66: Synthetisch dargestellte halogenierte (**296**, **297**, **298**, **299**, **300**), *p*-substituierte (**301**, **302**, **303**, **304**) und heterozyklische (**305**, **306**, **307**) α -D-Hydroxysäuren.

Das benzylethergeschützte *p*-Hydroxy-D-phenyllactat (**303**) war aufgrund seines ausgeprägten hydrophoben Charakters in 0.5 M schwefelsaurer Reaktionslösung so gut wie unlöslich. Nur durch den tropfenweisen Zusatz von THF, Ultraschall und Wasserbad (40 °C) war es möglich die Aminosäure H₂N-D-Tyrosin(OBzl)-OH in Lösung zu bringen. Das Abkühlen der Reaktionslösung auf 0 °C führte zum erneuten Ausfallen des Substrats, so dass die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Die veränderten Reaktionsbedingungen hatten glücklicherweise kaum einen Einfluss auf die Ausbeute des *p*-

Hydroxy-D-phenyllactats(OBzl)-OH **303** von 79%. Die darauffolgende Hydrogenolyse mittels Pd/C (10%) in Methanol und H₂-Atmosphäre zum entschützten der Seitenkette von *p*-Hydroxy-D-phenyllactat-OH (**304**) verlief quantitativ. Bei den heterozyklischen Derivaten ließ sich die Thienyl-Verbindung (**305**) mit sehr guten Ausbeuten von 73% darstellen, im Gegensatz zum Imidazol-Derivat (**306**), dass aufgrund des zusätzlich freien Elektronenpaares, welches nicht in das π -Elektronensystem eingebunden ist eine bevorzugte Stelle für den Angriff von Protonen und anderen Elektrophilen (z.B. Nitrosyl-Kation) bietet. Die Ausbeute für das tosylgeschützte Imidazol-Derivat **306** betrug nur noch 39%. Die nachfolgende Entschützung mittels Phenyltrimethylsilyllithium in THF verlief nach Protokoll, und entsprach mit einer Ausbeute von 78% für das entschützte Imidazol-Derivat **307** auch den publizierten Ergebnissen für Tosylentschützungen.

Zusammenfassend konnten alle α -D-Hydroxycarbonsäuren in Mengen von 500 mg bis 5 g über maximal drei, bzw. zwei Stufen in zum Teil sehr zeitintensiven Synthesen zugänglich gemacht werden. Als besonders arbeitsintensiv stellte sich die Darstellung der stark hydrophoben Verbindungen (**262**, **286**, **293**, **294**, **295**, **303**) heraus. Große Bemühungen hinsichtlich einer Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden nicht unternommen, da die synthetisierten Verbindungen in ausreichenden Mengen für den vorgesehenen *in vitro*-Assay dargestellt wurden. Es war möglich über eine prinzipiell einfache Methode unter geringfügigen Modifikationen der Reaktionsbedingungen, ein breites und umfangreiches Spektrum an α -D-Hydroxycarbonsäuren zu synthetisieren. Abschließend ist zu sagen, dass aufgrund der erfolgreichen Synthese dieser α -D-Hydroxysäuren-Bibliothek der Grundstein für die Untersuchung der α -D-Hydroxysäurenbindungsstellen der ESyn und PFSyn gelegt wurde. Ergebnisse zu der *in vitro*-Synthese neuer Enniatin- und PF 1022-Derivate werden in einem späteren Abschnitt diskutiert.

4.2 Aufbau einer gegen Cysteinproteasen gerichteten Tripeptid-Inhibitorbibliothek

Das große Interesse an den papainähnlichen Cysteinproteasen der Familien C01 und C02 (s. Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3) führte in den letzten Jahren zu verstärkten Bemühungen der Synthese geeigneter Inhibitoren für diese Enzyme. Um ein rationales Inhibitor-Design zu ermöglichen, wurde eine Vielzahl von SAR-Studien hinsichtlich der katalytischen Zentren der papainähnlichen Cysteinproteasen vorgestellt. Jedoch handelt es sich im Fall der Inhibitor-basierenden Studien meist um die Verbesserung von Leitstrukturen und es existieren wenige Daten aus systematischen Screenings zur Untersuchung der Präferenzen der Bindungstaschen. Beispielsweise veröffentlichte Donkor *et al.* eine Studie mit an Chlormethylketone

konjugierten Tripeptiden zur Untersuchung der Präferenzen von Calpain.^[337] Bogyo und Mitarbeiter betrieben Untersuchungen bezüglich E-64 abgeleiteter Inhibitor-Bibliotheken in den Positionen P2 bis P4 mit proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren. Es wurden verschiedene Cathepsine, sowohl in isolierter Form, als auch als Mischung von zellulären Proteinextrakten untersucht.^[191,196,197] Hauptsächlich handelt es sich jedoch um geringfügige Optimierungen von Leitstrukturen, sowie um Untersuchungen der Bindungstaschen S4, S3 und S2 (s. Abschnitt 2.3.6). Es sind keine Daten aus einem systematischen Screening zur Untersuchung der Präferenzen der Bindungstasche S1 in Verbindung mit einer elektrophilen Kopfgruppe (Abbildung 67 und 68) bekannt. Die meisten Daten beziehen sich fast ausnahmslos auf die „*ungestrichene*“-Seite des katalytischen Spalts, so dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur unzureichende Kenntnisse über die S'-Region dieser Proteasen vorhanden ist. Auch für Cathepsin B, in dem der alternative Bindungsmodus (s. Abschnitt 2.3.6) der CA030-Derivate den peptidischen Teil der Inhibitoren auf die „*gestrichene*“-Seite zwingt, sind im Bereich der S'-Taschen strukturell nur einzelne Punkte auf der topographischen Karte abgesteckt.

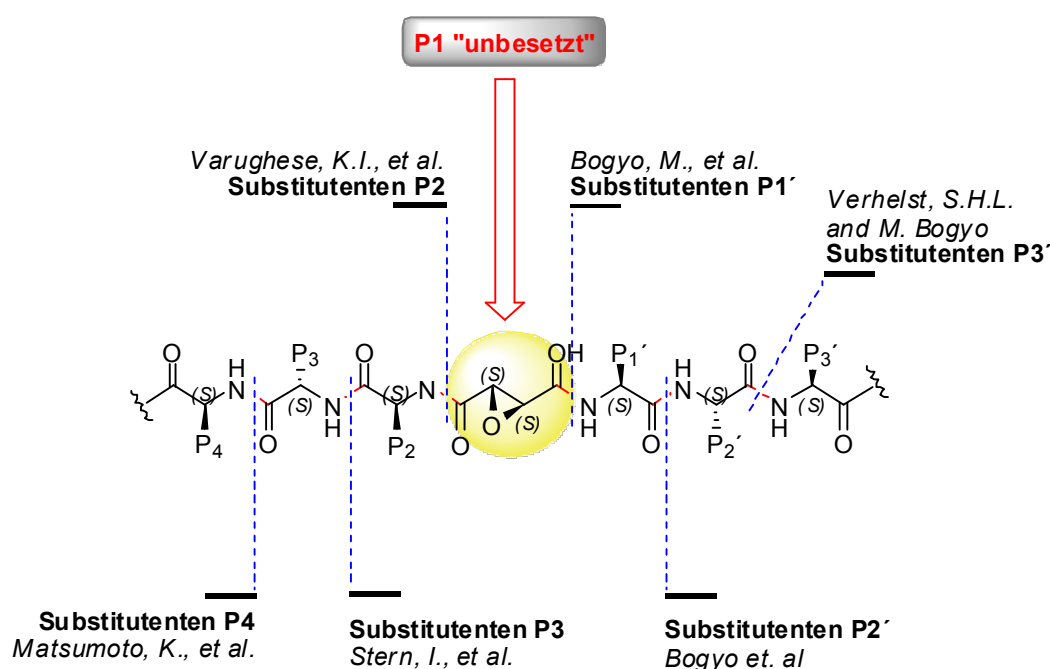


Abbildung 67: Schematische Darstellung der bisher untersuchten Substitutionspräferenzen, modifizierter und optimierter Seitenkettenfunktionalitäten der papainähnlichen Cystein-proteaseinhibitoren.

Zudem handelte es sich bei dem Bindungsmodus („*gestrichene*“-Seite) von CA030 (**32**) um eine zufällige Entdeckung, denn eigentlich wurde angenommen, dass **32** und seine Derivate analog zu E-64 (**21**) in die „*ungestrichene*“-Seite binden.^[162] Erst später erkannte man, dass

der Bindungsmodus der CA030-Derivate dem des eigentlichen Substrats gleicht, wobei ihre Aminosäureseitenketten in den S'-Taschen der Proteasen zum liegen kommen.^[164] In einer Reihe von Studien wurden die Substrat-Präferenzen der papainähnlichen Cysteinproteasen untersucht. Dies geschah durch Vergleich natürlicher Substrate^[338] oder mittels rationaler Bibliotheken, wie *Positional scanning libraries*,^[339-341] *Phage-Display*,^[342] komplette randomisiert,^[343] oder wissensbasierte Substratbibliotheken.^[18,66,344] Diese Ergebnisse sind jedoch nicht uneingeschränkt übertragbar auf die Entwicklung von neuen Inhibitoren, da ihre Bindung, insbesondere die irreversibler Inhibitoren, anderen Gesetzmäßigkeiten folgt. Die pharmakologischen Eigenschaften, seine einzigartige Molekülarchitektur und die selektive Inhibierung der papainähnlichen Cysteinproteasen durch E-64 (**21**) (s. Abschnitt 2.3.) machen diesen Naturstoff zu einer sehr interessanten Leitstruktur für den Medizinalchemiker.

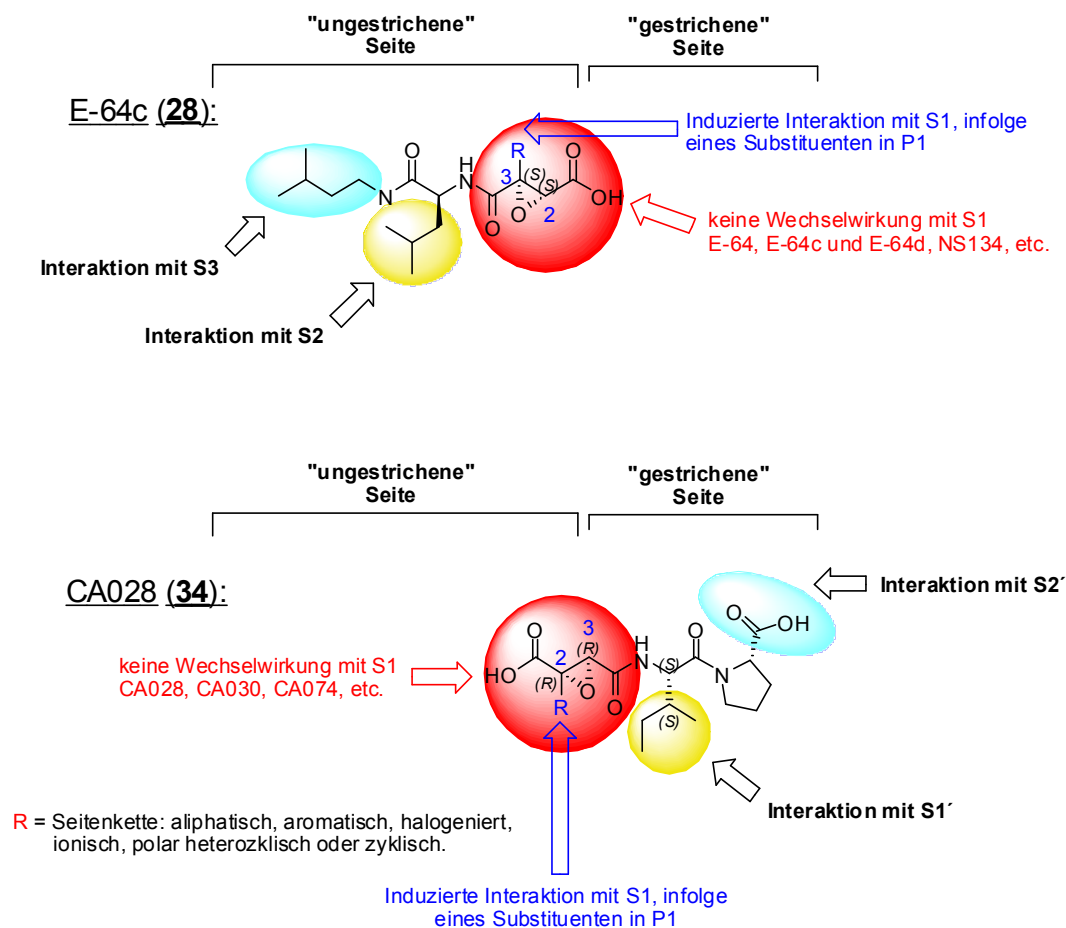


Abbildung 68: Schematische Darstellung der Cysteinprotease-Inhibitoren E-64c (**24**) und CA028 (**34**), unter Berücksichtigung ihrer spezifischen Wechselwirkungen mit dem katalytischen Spalt von Cathepsin B. Mit R (Seitenkette) wurde eine mögliche Interaktion mit S1 durch das Einführen eines Substituenten gekennzeichnet welche den Inhibitoren E-64c (**24**) und CA028 (**34**) fehlt.

Dies liegt nicht nur daran, dass bislang keine synthetischen Arbeiten zur Modifikation von elektrophilen „Warheads“ existieren, sondern auch an einer bisher unzureichenden Selektivität von E-64 (**21**) und seinen Derivaten (**23**, **24**) innerhalb der Familie der papain-ähnlichen Cysteinproteasen. Zudem existieren bisher keine Studien über den Einfluss von P1-substituierten elektrophilen Warheads hinsichtlich ihrer Reaktivität und Selektivität gegenüber den papainähnlichen Cysteinproteasen (Abbildung 68). Die Dipeptideinheiten *E64c-like* (**308**, Abbildung 69) und *CA028-like* (**309**, Abbildung 70) wurden so gewählt, dass eine Beschränkung auf Clan CA, Familie C01 und C02 bestand. Der hochkonservierte Bindungsmodus der E-64c-^[158-161] und CA028-Derivate^[162-165] sicherte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ab. Die hier verwendeten Leitstrukturen (**308**)^[160] und (**309**)^[199] (Abbildung 69 und 70) zeichnen sich durch ihre besonders hohe Aktivität gegenüber Cathepsinen aus. Bei den *E64c-like* Inhibitoren (**308**) ist die S2-Position mit einem Leucin ideal belegt, da papainähnliche Cysteinproteasen diese oder auch andere hydrophobe Seitenketten bevorzugen, wie aus unterschiedlichen Studien klar hervorgeht.^[26,128,131,161,345-348] Zwar zeigt sich für Cathepsin B eine Bevorzugung substituierter Aromaten in der P2-Position, jedoch wird Leucin ebenfalls hervorragend akzeptiert.^[67]

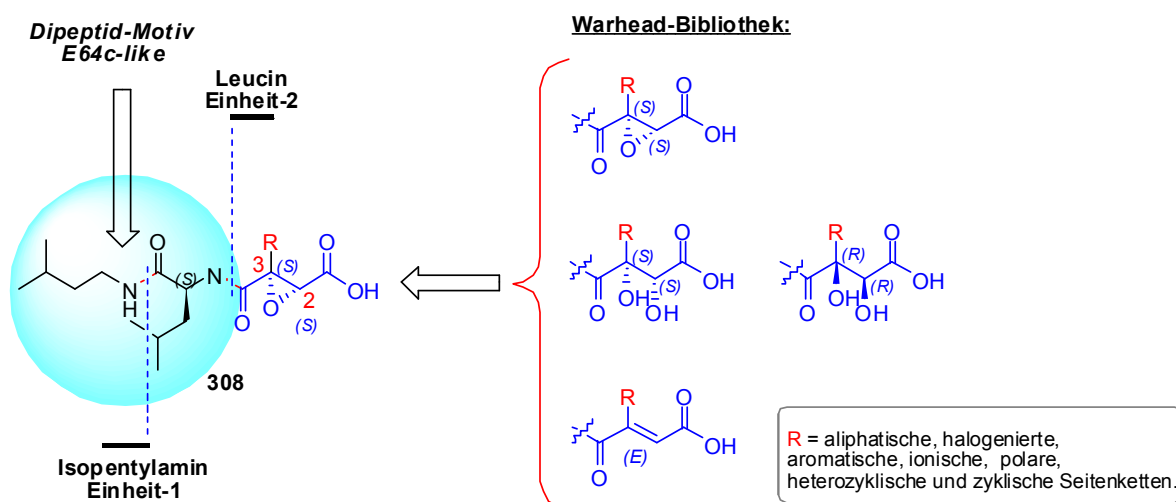


Abbildung 69: *E64c-like*-Dipeptidmotiv (**308**): Durch Kombination der Dipeptideinheit mit unterschiedlich substituierten „Warheads“ sollte der Einfluss von R (aliphatischen, halogenierten, aromatischen, ionischen, polaren, heterozyklischen, oder zyklischen Seitenketten) auf die S1-Tasche bezüglich einer veränderten Reaktivität bzw. Selektivität gegenüber den papainähnlichen Cysteinproteasen untersucht werden.

Da oberhalb von S3 eine hydrophobe Fläche vorzufinden ist,^[46,131,161,181] und diese mit der Isopentyl-Einheit und die Leucinseitenkette mit S2 spezifisch interagiert, ist die verwendete Dipeptideinheit von *E64c-like* (**308**) ideal geeignet die Inhibitoren in vergleichbarer und

reproduzierbarer Weise für die Interaktion mit den Mitgliedern der papainähnlichen Cysteinproteasen zu positionieren. Das gleiche gilt auch für *CA028-like* Inhibitoren (**309**, Abbildung 70) welche aufgrund ihres speziellen Bindungsmodus in die „gestrichene“-Seite des katalytischen Spalts von Cathepsin B bindet. Die Carboxygruppe des L-Prolins (**209**), als auch seine zyklische Struktur bilden die Grundlage für die selektive Hemmung von Cathepsin B.^[180] Die molekulare Struktur des Prolins passt exakt in die sog. „occluding loop“ und dirigiert dadurch das inhibitorische Peptid (**309**) in die „gestrichene“-Seite des katalytischen Spalts, wobei es zu Wasserstoffbrückenbildung zwischen der Carboxygruppe von L-Prolin und zwei Histidin-Resten der S2'-Tasche kommt. Additiv unterstützt die zweite Aminosäure L-Isoleucin auch den selektiven Bindungsmodus, da sich die verzweigte hydrophobe Einheit sehr gut in die S1'-Tasche von Cathepsin B einpasst. Die restlichen Wechselwirkungen finden über das Peptidrückgrat statt; hierbei kommt es hauptsächlich zu Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonyl-Gruppen der Epoxysuccinyl-Einheit. Unter diesen Aspekten war das *CA028-like*-Dipeptid-Motiv (**309**) der geeignete Gegenspieler für das *E64c-like*-Dipeptid (**308**). Durch die Wahl des *E64c-like*-Dipeptids (**308**) soll die Grundlage für eine Bindung in die „ungestrichene“-Seite des Bindungsspalts gelegt werden, und damit der Einfluss der substituierten „Warheads“ auf die Selektivität und Reaktivität untersucht werden.

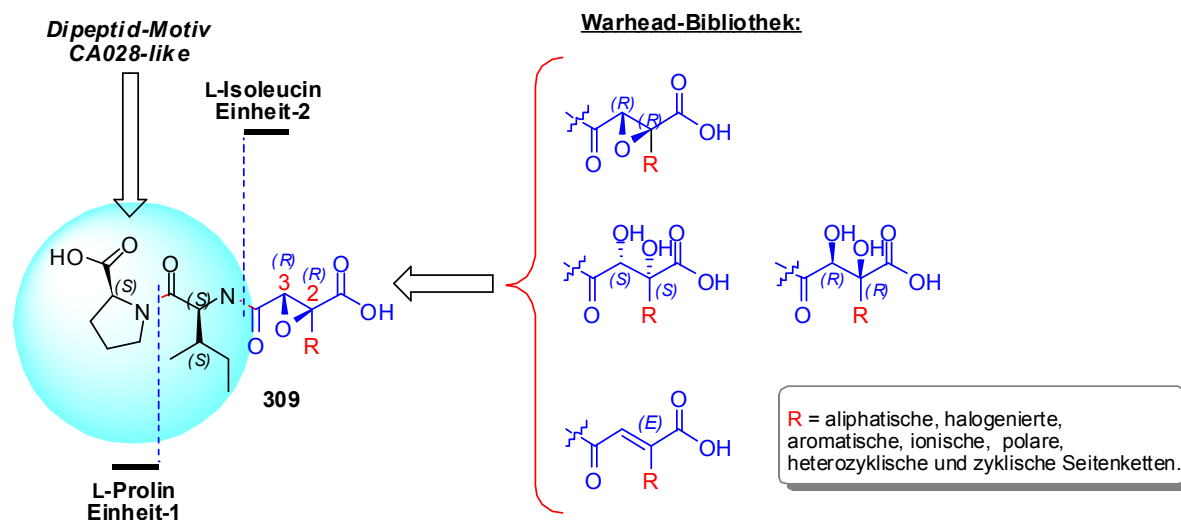


Abbildung 70: *CA028-like*-Dipeptidmotiv (**309**): Durch Kombination der Dipeptideinheit mit unterschiedlich substituierten „Warheads“ sollte der Einfluss von R (aliphatischen, halogenierten, aromatischen, ionischen, polaren, heterozyklischen, oder zyklischen Seitenketten) auf die S1-Tasche hinsichtlich einer veränderten Reaktivität bzw. Selektivität gegenüber den papainähnlichen Cysteinproteasen untersucht werden.

Das gleiche gilt auch für die Wahl des *CA028-like* Dipeptids (**309**), welches aufgrund der erwähnten strukturellen Merkmale in die „gestrichene“-Seite des katalytischen Spalts binden sollte, um damit den Einfluss der elektrophilen Bausteine in einem inversen Bindungsmodus zu untersuchen. Zudem soll durch die zwei unterschiedlichen Bindungsmodi der Dipeptideinheiten der Einfluss inverser Stereoinformationen an den elektrophilen „Warheads“ bestimmt werden (Abbildung 70). Zudem wurde damit die Einbeziehung der Papaine als auch Cathepsine in die Studie erleichtert, da E-64c (**24**) und CA028 (**34**) sich durch ihre hohe Affinität zu den papainähnlichen Cysteinproteasen auszeichnen. Ein weiterer Vorteil dieser Peptide zeigt sich dadurch, dass Epoxide dieses Typs sehr gut zu handhaben sind. Sie sind in trockenem Zustand stabil und lagerbar. Im Gegensatz zu den Peptidylaldehyden sind sie ohne weitere Vorkehrungen wie Lichtausschluss oder Schutzgas über längere Zeiträume sogar bei Raumtemperatur lagerfähig. Allgemein besitzen Epoxybernsteinsäure-Derivate auch in Lösung nur eine sehr geringe Neigung zu unspezifischen Reaktionen. Die Epoxidgruppe zeigt sich erstaunlich reaktionsträge, ihre Handhabung ist sogar in stark basischen Medien mit Nucleophilen wie Hydroxy-Ionen (s. Abschnitt 2.3.6) unproblematisch. Hierauf begründet sich auch ihre Selektivität für Cysteinproteasen, da die Nucleophilie der katalytischen Thiolgruppe größer ist als die der Hydroxygruppe der Serinproteasen oder anderer freier Thiole. Das zeigt sich besonders eindrucksvoll im Fall von Calpain, das in Abwesenheit von Calcium nicht durch E-64-Derivate inaktiviert wird,^[170] da die Nucleophilie der Thiolgruppe durch den fehlenden Ladungstransfer auf den Histidinrest der katalytischen Triade stark vermindert wird. Somit ist auch ihre Beständigkeit und Selektivität *in vitro* und *in vivo* von vornherein größer als bei anderen für Cysteinproteasen gebräuchlichen Inhibitoren. Die Synthese wurde in drei Abschnitte aufgeteilt. Im Ersten Abschnitt sollten die trisubstituierten elektrophilen Einzelbausteine synthetisiert werden. Im zweiten Teil sollten die Dipeptid-Motive (**308**) und (**309**) für den kombinatorischen Aufbau der Inhibitorbibliothek dargestellt werden. Im letzten und dritten Abschnitt sollten die elektrophilen Einzelbausteine in Baukastenmanier miteinander gekuppelt werden, wobei ausschließlich die elektrophilen Bausteine randomisiert wurden. Im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Gruppen^[191,196,197] wurden die P3 und P2-Position für *E64c-like* (**308**) und die Positionen P1' und P2' für *CA028-like* (**309**) nicht randomisiert. Es wurde befürchtet, dass die einzelnen Beiträge der jeweils besten Aminosäure in P3 und P2 für *E64c-like*- und P1' und P2' für *CA028-like*-Inhibitoren aus solchen voneinander unabhängigen Experimenten nicht zwingend additiv sein müssen. Studien mit Inhibitoren für sowohl den „gestrichenen“ wie „ungestrichenen“ Abschnitt des katalytischen Spalts von Cathepsin B machten das bereits deutlich.^[67] Prinzipiell sollte eine vollständige Bibliothek von trisubstituierten „Warheads“ am besten geeignet sein für die Evaluierung der S1-Bindungstasche. Jedoch ist der Informationsgehalt, der aus einem solchen Ansatz gewonnen Ergebnisse, wenn überhaupt,

nur geringfügig größer, der Arbeitsaufwand jedoch ungleich höher. Daher wurde für die eingeführten Substitutionsmuster der elektrophilen „Warheads“ eine Vorauswahl hinsichtlich einzelner Funktionalitäten getroffen, und nicht das komplette Spektrum der Aminosäurenseitenkettenfunktionalitäten als „Warhead“-Substituenten dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wird die erste systematische Untersuchung der „*ungestrichenen*“-S1-Seite des katalytischen Spalts von papainähnlichen Cysteinproteasen mit Hilfe fokussierter Bibliotheken irreversibler Inhibitoren vorgestellt. Zudem wurde erstmals das Potential von 2,3-Diol-Warheads als mögliche reversible Inhibitoren der papainähnlichen Cysteinproteasen untersucht.

4.2.1 Synthesestudien zum Aufbau der Tripeptid-Inhibitoren an fester Phase

Ein schneller Zugang zu einer großen Zahl derivatisierter Strukturen sollte im Fall der aufzubauenden Tripeptidstrukturen mit Hilfe der kombinatorischen Synthese an fester Phase möglich sein. Aufgrund unzufriedenstellender Synthesestudien an fester Phase, mit den von mir synthetisierten Epoxysuccinyl-„Warheads“ wurde die Darstellung der Inhibitorbibliothek an fester Phase verworfen. Der Aufbau des festphasegebundenen Peptids wurde wie folgt durchgeführt (Abbildung 71): Die Belegung des Harzes mit der C-terminalen Aminosäure (Fmoc-L-Pro-OH) erfolgte durch Zusatz von DIPEA. 2-Chlorotriethylchloridharz (Belegung: max. 1.4 mmol/g) wurde hierzu in DCM vorgequollen, mit einer Mischung aus Fmoc-L-Pro-OH (3 eq) und DIPEA (6 eq) in DCM versetzt und nach zwei Stunden Reaktionszeit intensiv gewaschen (**1**).^[349] Die anschließenden Waschschrte wurden für jeden Kupplungs- oder Entschützungs Vorgang verwandt und umfassten DMF, MeOH, DMF und DCM (jeweils dreimal 10 ml). Nach zweifachem Capping mit einem Gemisch aus DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5), über einen Zeitraum von jeweils 10 Minuten, wurde gründlich gewaschen und nach Trocknung am Hochvakuum die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Hierzu wurde eine 20 %ige Lösung von Piperidin in DMF (orientiert an einer theoretischen Belegung von 1.4 mmol/g) dem vorgequollenen Harz in DMF zugesetzt. Nach 30 Minuten war die Fmoc-Abspaltung abgeschlossen. Nach Waschen und Trocknen unter Hochvakuumbedingungen wurde die ermittelte Gewichts Differenz der trockenen Harzmenge vor und nach der Entschützung zur Berechnung der Belegung herangezogen. Mit Harzmengen von 100 - 200 mg wurden in mehreren Versuchen reproduzierbare Belegungen von 0.4 - 0.6 mmol/g ermittelt. Die Synthese des Dipeptids (**2**) mit Fmoc-L-Ile-OH (2.5 eq, 2.5 eq DIC, 5.0 eq HOBt, DIPEA) in DCM über einen Zeitraum von 3 Stunden führte zu einer unvollständigen Kupplung, was durch Untersuchungen von kleinen Harzmengen mittels Kaiser-Test und

Probenabspaltung (HPLC-MS-Analytik) bestätigt wurde. Im letzten Reaktionsschritt wurden die Epoxysuccinyl-Derivate unter Zugabe von PyBOP und TBTU als Aktivierungsreagenz und DIPEA als Base in DCM gelöst und an der festen Phase mit dem Dipeptid-Fragment gekuppelt (Abbildung 71), wobei die Kupplungsdauer 22 h betrug (**3**). Die Abspaltung des Tripeptids vom Trägermaterial und die gleichzeitige Entschützung der Carboxyfunktion erfolgt mittels TFA, DCM, TIPS in einem Reaktionsschritt (**4**). Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

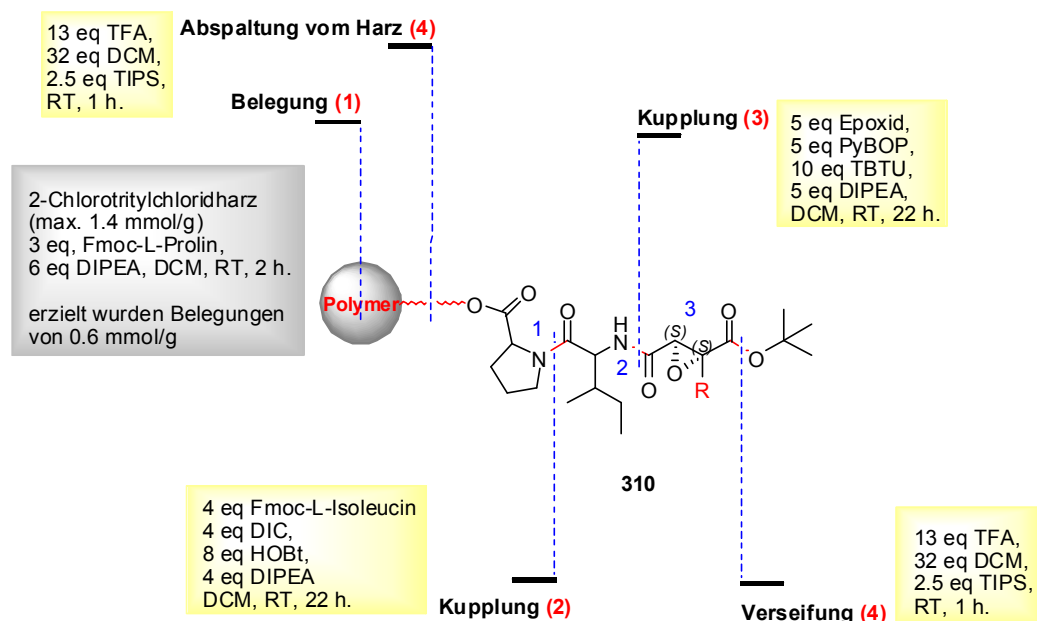


Abbildung 71: Schematische Darstellung der festphasengestützten Synthese von **310** am polymeren Träger. Während die Belegung des Harzes und der erste Kupplungsschritt problemlos verliefen, führte die Kupplung der Epoxysuccinate nahezu zu keinem Produkt.

Bei einer Gesamtausbeute von <4%, und einer Vielzahl von nicht abtrennbaren Diastereomeren, sowie unzureichenden Optimierungsversuchen seitens der Kupplungseffizienz der Epoxysuccinate wurde von der Darstellung einer Inhibitorbibliothek an fester Phase abgesehen. Diese Erkenntnisse legten den Schluss nahe, dass ein Aufbau der gewünschten Strukturen in Lösung mit der Wahl anderer Kupplungsreagenzien zu bevorzugen ist. Nur auf diesem Wege kann der Grad einer möglichen Epimerisierung oder Verunreinigung nach jedem Kupplungsschritt durch fundierte Analytik quantifiziert werden. Außerdem ermöglicht die Synthese in Lösung die chromatographische Abtrennung unerwünschter Nebenprodukte nach jeder Umsetzung.

4.2.2 Schematischer Aufbau der E64c- und CA028-like-Tripeptid-Inhibitorbibliothek

Im folgenden Abschnitt wird zunächst die Synthese der Dipeptid-Motive, der elektrophilen „Warheads“ und der Aufbau der Inhibitorbibliothek vorgestellt und die speziellen Probleme während der einzelnen Synthesen beleuchtet. In dem darauffolgenden Abschnitt werden die Hemmwerte der Inhibitorbibliothek und verschiedener Einzelverbindungen erläutert und im Vergleich mit Literaturdaten diskutiert. Bevor die einzelnen Schritte der Synthese besprochen werden, soll vorab der prinzipielle peptidsynthetische Aufbau der Tripeptide für die Darstellung der Inhibitorbibliothek anhand der verwendeten Leitstrukturen *E64c-like* (**308**) und *CA028-like* (**309**) in Abbildung 72 und 73 erläutert werden. In Anlehnung an die peptidsynthetischen Arbeiten von Sarabie *et al.*^[350] sollte für die oben beschriebene Inhibitorbibliothek ein geeignetes Syntheseprotokoll entwickelt werden, welches den schrittweisen Aufbau eines linearen Tripeptids in Lösung vorsah und nach finaler Abspaltung der Schutzgruppen den schnellen Zugang zu einer Vielzahl von Tripeptid-Inhibitoren ermöglichen sollte. Hauptaufgabe war neben der Synthese der Warheads, diese razemisierungsfrei in Lösung zu kuppeln, zu entschützen und nach Aufreinigung die inhibitorische Aktivität der Tripeptide zu charakterisieren. Die Synthesekonzepte sind in Abbildung 72 und 73 schematisch dargestellt.

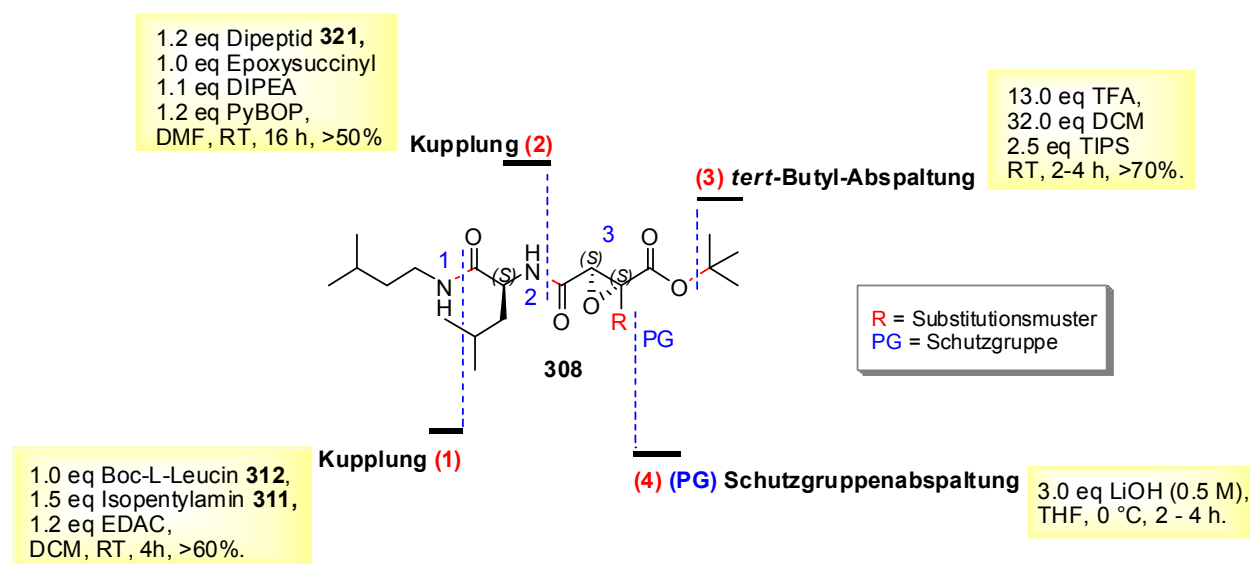


Abbildung 72: Schematische Darstellung der Syntheseschritte durch ein *E64c-like*-Tripeptid (**308**). Über zwei Kupplungsschritte **(1)** und **(2)** und anschließender Abspaltung der permanenten Schutzgruppen **(3)** und **(4)** sollte das fertige Tripeptid zugänglich sein. Die Kupplung **(2)** der elektrophilen Warheads sollte unter Ausschluss nucleophiler Kupplungs-Reagenzien erfolgen.

Das Schema für die *E64c-like* (**308**) als auch für *CA028-like* (**309**) Tripeptide sieht die schrittweise Kupplung der Aminosäuren als auch der elektrophilen Bausteine vor. Die Einführung polarer R-Seitenkettenfunktionalitäten hatte bei der Ausarbeitung einer orthogonalen Synthesestrategie dazu bewogen, permanente Schutzgruppen an den polaren, basischen und sauren Seitenketten der Warheads einzuführen, vor allem um mögliche Oxidationen dieser Funktionalitäten oder Nebenreaktionen im Laufe der Synthesen zu unterbinden. Als für diesen Zweck sinnvoll erschien die Einführung von Benzylethern an Threonin-, Serin-, Tyrosin-, von Benzylestern an Aspartat-, und Glutamat-, sowie eine Tosylierung der sekundären Amine von Histidin-, und Tryptophan-, als auch die Dialkylierung der Lysin-, und Asparagin-Seitenketten. Als temporäre Aminoschutzgruppe wurde die Boc-Funktion gewählt, welche schnell und unkompliziert mit TFA in DCM innerhalb 1 h quantitativ abgespalten wird.^[335] Das Entfernen der Benzylester und Benzylether, sowie die Entschützung der dialkylierten Amine sollte unter pH-neutralen und milden Bedingungen mittels Hydrogenolyse gelingen.

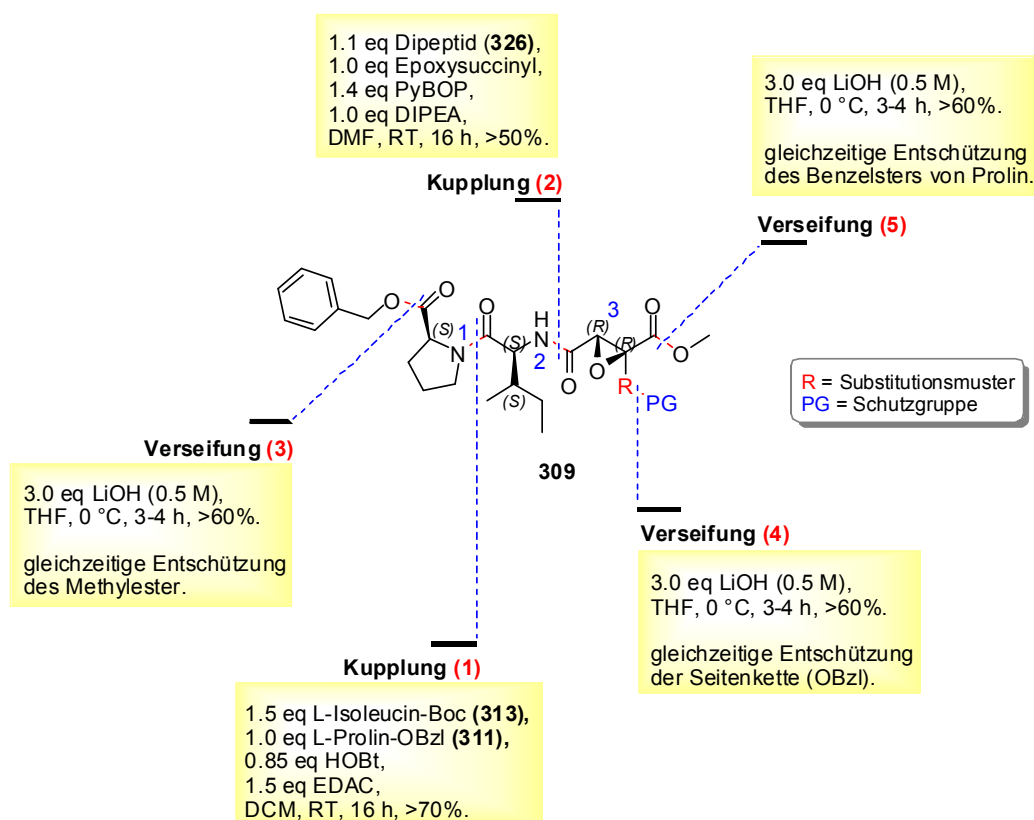


Abbildung 73: Schematische Darstellung der Syntheseschritte durch ein *CA028-like* Tripeptid (**309**). Über zwei Kupplungsschritte (**1**) und (**2**) und anschließender Abspaltung der permanenten Schutzgruppen (**3**), (**4**) und (**5**) sollte das fertige Tripeptid zugänglich sein. Die Kupplung (**2**) der elektrophilen Warheads sollte unter Ausschluss nucleophiler Kupplungs-Reagenzien erfolgen.

Für die Synthese der erforderlichen Dipeptide (**313**) und (**320**) wurde entweder ausschließlich EDC, oder eine Kombination aus EDC und HOBt zur Kupplung eingesetzt. Die Verknüpfung der Dipeptidbausteine mit den elektrophilen Warheads sollte mit einer Kombination aus PyBOP und DIPEA realisiert werden.^[350] Die hydrogenolytische Abspaltung der permanenten Schutzgruppen kann in Methanol oder THF mit Zusatz von Ameisensäure durch Palladium auf Aktivkohle (Pd/C (10%)) erfolgen. Die Entschützung der Methylester sollte unter basischen Bedingungen durch LiOH (0.5 M) in THF, und die der *tert*-Butylester der unter sauren Bedingungen mittels TFA in DCM in Anwesenheit von TIPS erfolgen^[335] (s. Abbildung 72 und 73).

4.2.3 Synthese der *E64c*- und *CA028-like*-Dipeptide

Ausgangsverbindungen für die Synthese der Dipeptide **314** und **321** sind fünf Aminosäuren und ein aliphatisches Amin (Abbildung 74), von denen alle, nämlich (*S*)-H₂N-Pro-OBzl·HCl (**311**), (*S*)-*N*-Boc-Leu-OH (**312**), (*S*)-*N*-Boc-Ile-OH (**313**), (*S*)-*N*-Boc-Val-OH (**314**), (*S*)-*N*-Boc-Phe-OH (**315**) und Isopentylamin (**316**) kommerziell erhältlich sind.

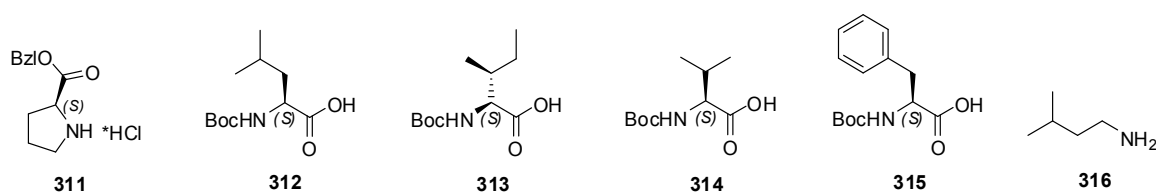


Abbildung 74: Verwendete Aminosäuren **311** – **315** und Isopentylamin (**316**) für die Synthese der Dipeptid-Motive *E64c-like* und *CA028-like*.

Die Dipeptide **317-320** wurden durch Kupplung von kommerziell erhältlichen Aminosäurebausteinen **312-316** mittels Zusatz von EDC, in DCM unter Schutzgasatmosphäre (Argon) dargestellt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel; EtOAc/*n*-Hexan = 1:2) wurden die Zielstrukturen in Ausbeuten von >60% erhalten (Abbildung 75A). Durch Racemisierung an C_α-Atomen entstandene Diastereomere waren nicht nachweisbar. Im hauptsächlichen Fokus der Synthese lag jedoch die Darstellung des Dipeptids **317** (*E64c-like*). Die zusätzlich synthetisierten Dipeptide **318-320** wurden für eine mögliche Randomisierung der Dipeptidbausteine dargestellt, jedoch nicht weiter verwendet. Dipeptid **317** (*E64c-like*) wurde mit TFA und DCM, in Anwesenheit von TIPS *N*-terminal Boc-entschützt. Nach einer Reaktionszeit von 1 h und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel; Chloro-

form/Methanol = 9:1) wurde die Zielstruktur **321** in einer Ausbeute von 98% erhalten. In Abbildung 78 sind die NMR-Spektren des enantiomerenreinen Dipeptids **321** aufgeführt. Die Lagerung von **321** erfolgte bei -4 °C, da eine längere Lagerung bei Raumtemperatur zu unerwünschter Zersetzung führte.

Für die Synthese der Dipeptidbausteine **322-325** war die Kupplung der kommerziell erhältlichen Bausteine **311-315** in einer Kombination von EDC und HOBt, in DCM unter Schutzgasatmosphäre (Argon) notwendig (Abbildung 75B). Nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel; EtOAc/*n*-Hexan = 1:3) konnten die Dipeptide **322-325** in Ausbeuten von >98% dargestellt werden. Bei der Synthese dieser Dipeptid-Motive lag das Augenmerk auf der Darstellung der Dipeptidstruktur **322** (*CA028-like*). Denn auch hier wurden die Dipeptide **323-325** für eine mögliche Randomisierung dargestellt. Die *N*-terminale Boc-Entschützung von Dipeptid **322** erfolgt mittels TFA und DCM in Anwesenheit von TIPS als Scavenger, in 1 h bei Raumtemperatur in Ausbeuten von 92%. In Abbildung 77 sind die NMR-Spektren des enantiomerenreinen Dipeptids **326** aufgeführt.

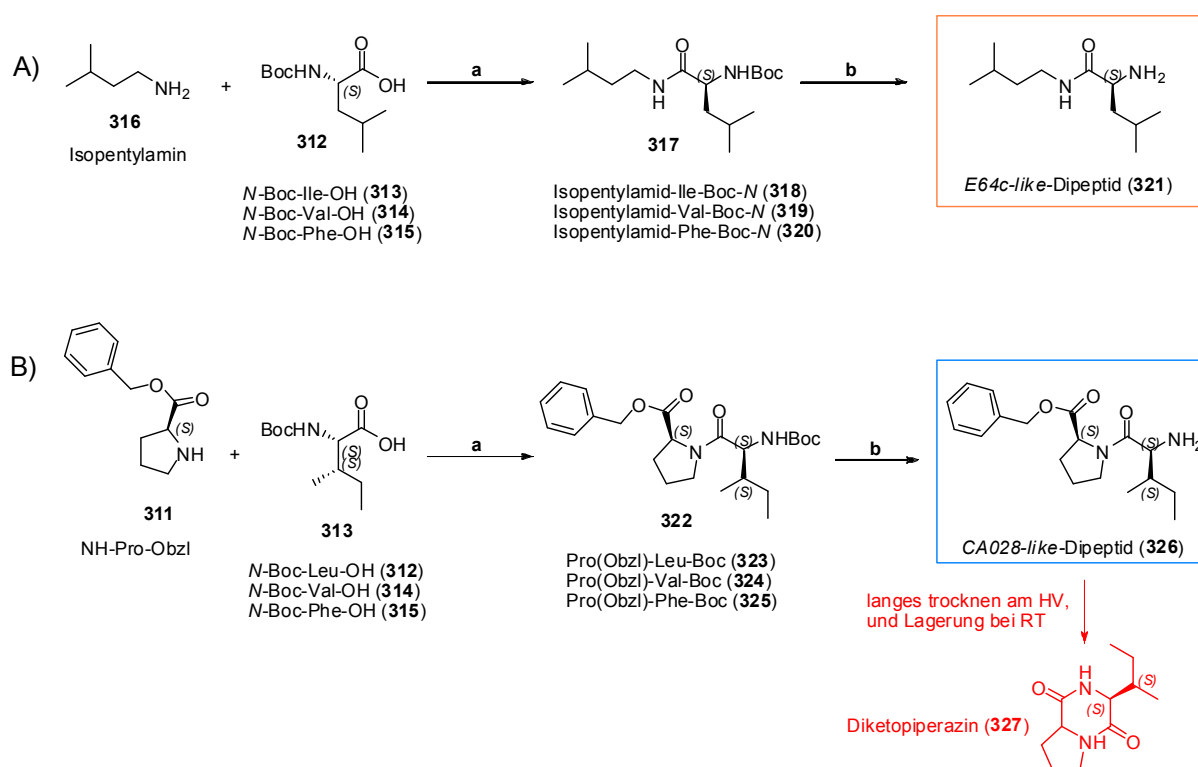


Abbildung 75: A) Synthese des *E64c-like*-Dipeptidbausteins **321**: a) EDC, DCM, RT, 4 h, >60%; b) TFA, DCM, TIPS, RT, 1 h, 98%. B) Synthese des *CA028-like*-Dipeptidbausteins **326**: a) EDC, HOBt, DCM, RT, 16 h, >60%; b) TFA, DCM, TIPS, RT, 1 h, 92%. Zu langes Trocknen am Hochvakuum (12 h), sowie Lagerung bei Raumtemperatur führt zur Bildung des unerwünschten Diketopiperazins **327**.

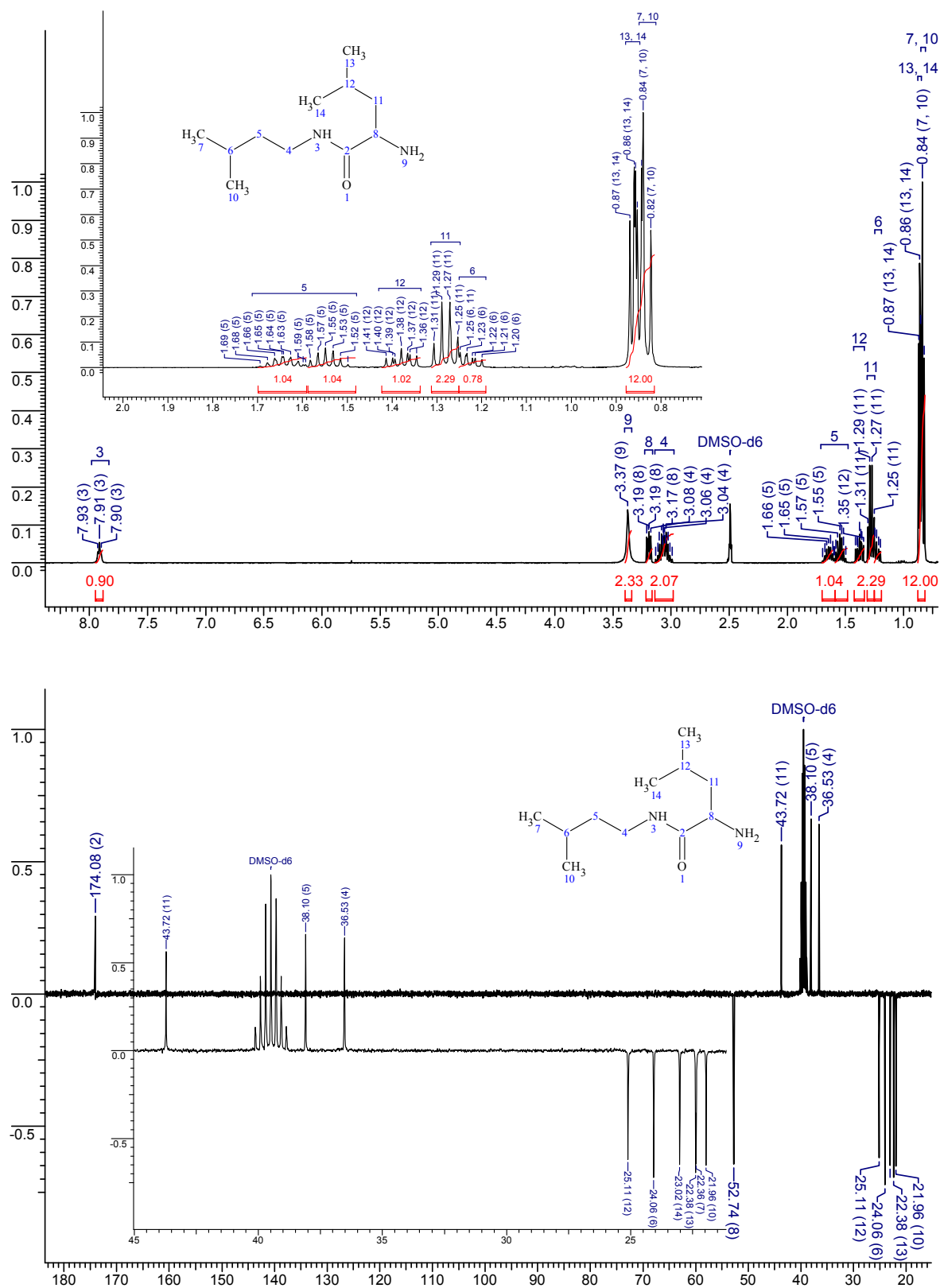


Abbildung 76: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von *E64c-like*-Dipeptid H₂N-Leu-Isopentylamid **321** nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie in DMSO-d₆ (2.49 bzw. 39.5 ppm). Bei 3.19 ppm im ¹H-, und 52.74 ppm im ¹³C-Spektrum ist das Proton am C_α-Atom zu sehen, wobei keine Dopplung des Singalmusters, und dadurch eine Bildung von Diastereomeren beobachtet werden konnte.

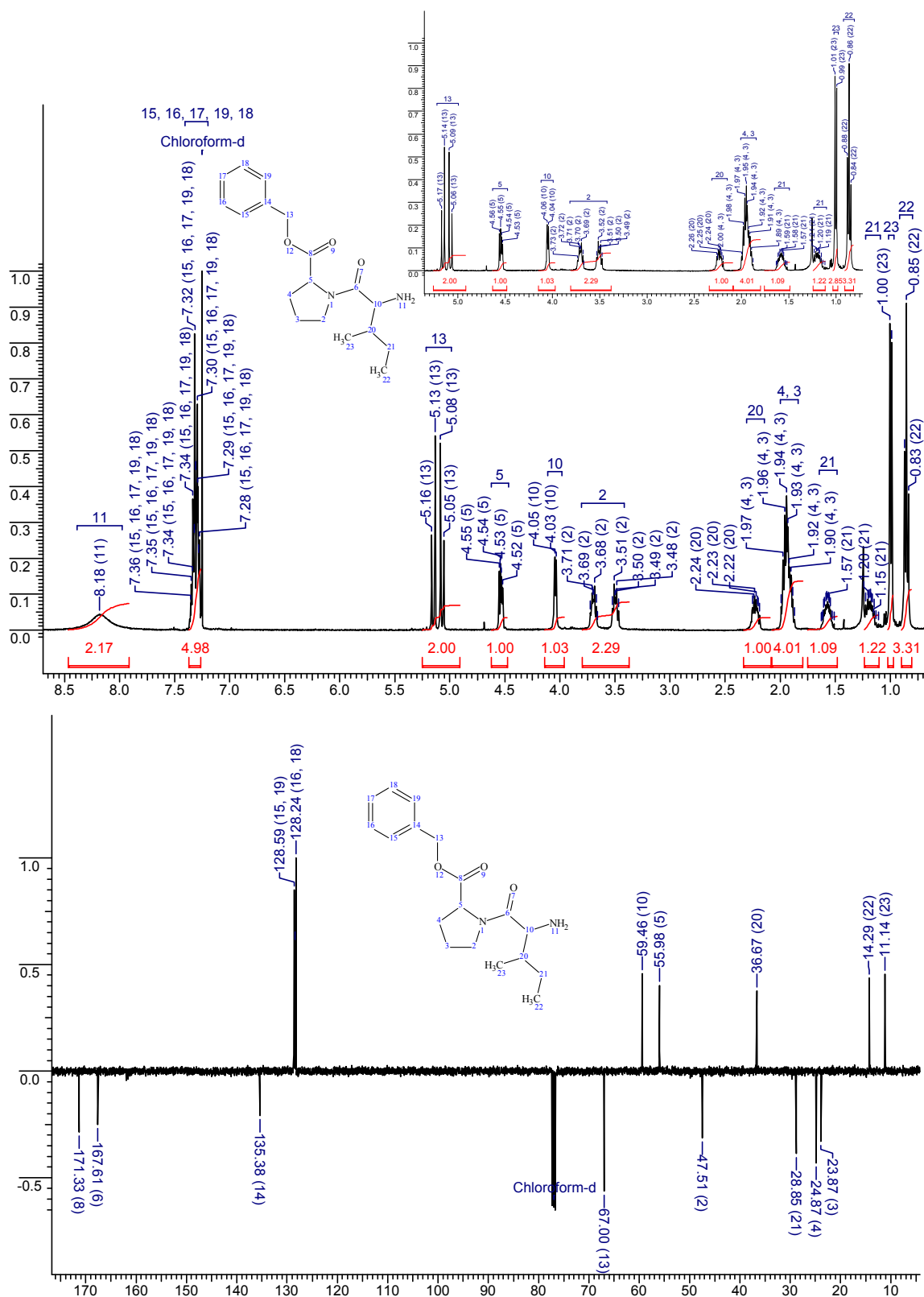


Abbildung 77: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von CA028-like-Dipeptid H₂N-Ile-Pro-OBzl **326** nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie in CDCl₃ (7.25 bzw. 77.0 ppm). Bei Betrachtung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum bei 4.06 ppm und 59.46 ppm im ¹³C-NMR-Spektrum, erkennt man deutlich, dass kein Edukt bzw. unerwünschte diastereomere Verbindungen vorliegen.

Es konnte keine Bildung von unerwünschten Diastereomeren nachgewiesen werden. Die einzige Komplikation war die Diketopiperazinbildung (**327**) von Dipeptid **326** (*CA028-like*), bei längerem Trocknen am Hochvakuum oder Lagerung bei Raumtemperatur. Die Lagerung des entschützten Dipeptids **326** erfolgte unter Schutzgasatmosphäre (Argon) bei -20 °C im Gefrierschrank.

Der Aufbau der *E64c*- und *CA028-like* Dipeptide ließ sich ohne Modifikation des publizierten Syntheseprotokolls realisieren. Jedes der acht Dipeptide konnte mit zufriedenstellenden Ausbeuten (>60%), ohne Diastereomerenbildung dargestellt werden. Prinzipiell lässt sich mit den angewendeten Syntheseprotokollen eine Vielzahl von Dipeptideinheiten für eine mögliche Randomisierung der P3-, P2- oder P1'-, P2'-Seiten darstellen. Durch die einfach zugängliche Darstellung von randomisierten Dipeptidbausteinen, und anschließender Kupplung der bestehende Bibliothek elektrophiler Bausteine ließe sich eine sog. *Positional scanning library* darstellen.

4.2.4 Synthese der elektrophilen „Warheads“

Die Synthese der elektrophilen „Warheads“ möchte ich in drei Teile gliedern. Im ersten Abschnitt werde ich auf die Synthesestrategien zur Darstellung der α -Ketosäureester eingehen. Sie bilden die Grundlage für die Darstellung der (*E*)- bzw. (*Z*)-Alkene. Aufgrund der unterschiedlichen Funktionalitäten der eingesetzten Aminosäuren war die Umsetzung eines einheitlichen Syntheseprotokolls zur Darstellung der α -Ketosäureester nur begrenzt möglich. Der zweite Teil bezieht sich ausschließlich auf die *E*- bzw. *Z*-selektive Synthese der trisubstituierten Alkene, denen eine Schlüsselposition beim Aufbau der „Warheads“ zukommt. Zum einen stellen sie die ersten potentiellen elektrophilen Verbindungen dar, zum anderen bilden sie die Edukte, und damit die Grundlage für die Synthese der Diol- und Epoxid-Verbindungen. Den möglichen Synthesewegen zur enantioselektiven Darstellung der Diole und Epoxide ist der dritte Abschnitt gewidmet.

4.2.4.1 Retrosynthetische Analyse

Als Grundlage für die Einführung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Substitutionsmuster an einem „Warhead“ sollten die kommerziell erhältlichen proteinogenen und nicht-proteinogene Aminosäuren dienen. Da es während der Synthese aufgrund wechselnder Reaktionsbedingungen zu Unverträglichkeiten der einen oder anderen Seitenkette (Funktionalität) kommen kann, wurde die Synthese mit einem sogenannten „überlagerten“ Spektrum ähnlicher Aminosäuren begonnen. So wurde z.B. nicht nur eine aliphatische,

zyklische, polare oder aromatische Aminosäure verwendet, sonder mindestens zwei Aminosäuren ähnlicher Funktionalität. Beispielsweise wurde als Repräsentant für die aromatische Seitenkettenfunktionalität Phg, Phe und für die der aliphatischen Ala, Leu, Val und Ile eingesetzt, um somit zumindest am Ende der Synthese von jeder Funktionalität eine Repräsentanten übrig zu haben.

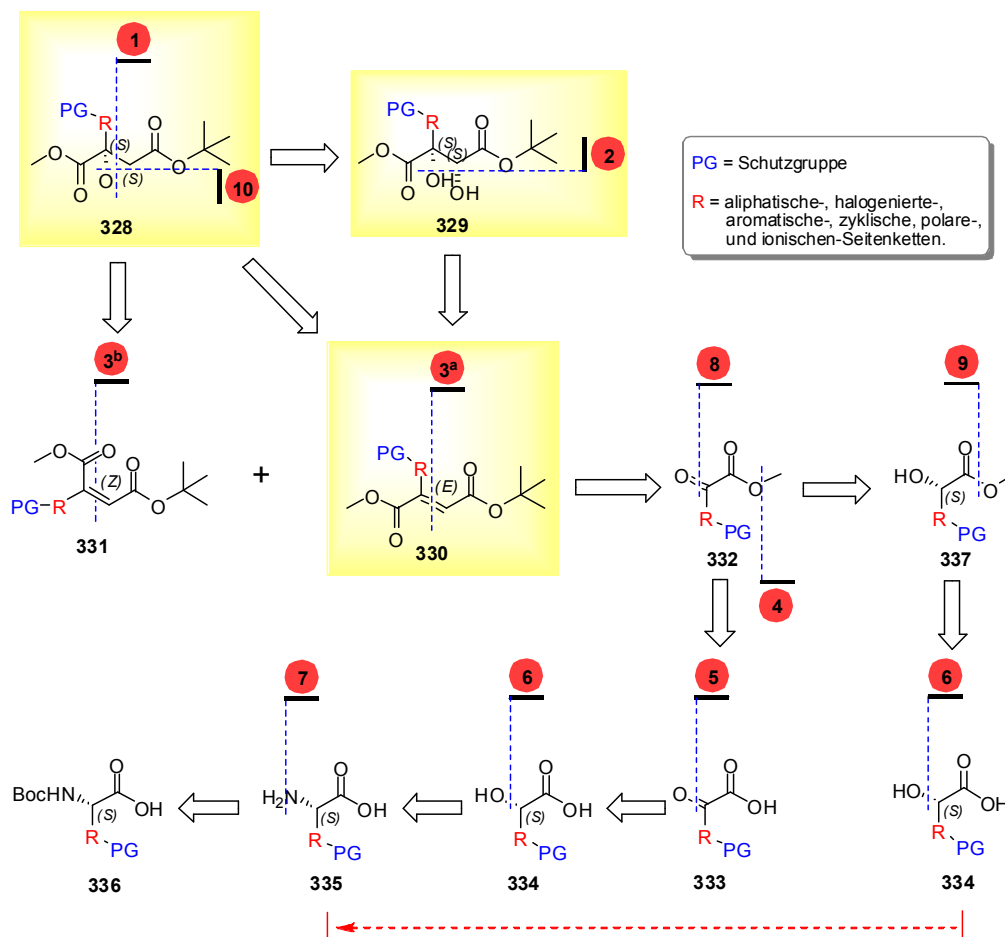


Abbildung 78: Retrosynthesekonzept für den Aufbau von trisubstituierten „Warheads“ **328** (Epoxide), **329** (Dirole), **330** (E-Alkene) und **331** (Z-Alkene) durch iterative Funktionalisierung ausgehend von α -L-Aminosäuren **336**. Wobei die primären Syntheseschritte aufeinanderfolgend in Diazotierung, Oxidation, Olefinierung, Dihydroxylierung und Epoxidierung gegliedert sind. Für eine orthogonale Schutzgruppenstrategie der Carboxyfunktionen kam der Methyl- bzw. *tert*-Butylester zum Einsatz. Die asymmetrische Dihydroxylierung mit anschließender Überführung zum Epoxid erfolgt in Anlehnung an die Arbeiten von B. Sharpless *et al.*^[247,248]

Das in Abbildung 78 gezeigte, Retrosynthesekonzept sieht den iterativen Aufbau der elektrophilen „Warheads“ (gelb unterlegt) ausgehend von α -L-Aminosäuren vor. Die Überführung der L-Aminosäuren **336** in die für die Darstellung der Alkene **330** und **331**

notwendigen Ketosäureester **332** war im Prinzip über eine vierstufige Synthese zugänglich. Im ersten Schritt der Synthese, wurden die seitenkettegeschützten Aminosäuren **336** *N*-terminal Boc-entschützt [7]. In den Folgeschritten wurden die Aminosäuren **335** mittels enantioselektiver Diazotierung [6], gefolgt von einer Oxidation [5] und anschließender Veresterung [4] in die für die Olefinierung notwendigen α -Ketosäureester **332** umgesetzt. Ein zweites Synthesekonzept (Abbildung 78) sieht zuerst die Umsetzung der Hydroxysäure **334** in Hydroxysäureester **337** [8], mit anschließender Oxidation [9] zu Ketosäureester **332** vor. Aufgrund des breiten Spektrums unterschiedlicher Seitenkettenfunktionalitäten wurden beide Synthesekonzepte verwendet. Für die Darstellung der „Warheads“ (Alkene, Diole, Epoxide), und deren anschließenden Kupplung mit den Dipeptideinheiten (*E64c*- und *CA028-like*), war eine orthogonale Schutzgruppenstrategie zu wählen. Dazu wurden die Carboxygruppen, Methyl- und *tert*-Butylester geschützt. Die Synthese der trisubstituierten Alkene wurde über eine Wittig- [3^a] oder Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion [3^b] *E*-, bzw. *Z*-selektiv realisiert. Der darauffolgende Zugang zu den Epoxiden **328** konnte auf zwei Wegen erfolgen. Im ersten Ansatz wurden die Alkene **330** und **331** über eine Epoxidierungsreaktion [10] mittels Lithium-*tert*-butylhydroperoxid in die entsprechenden Epoxide **328** umgesetzt. Im zweiten Ansatz hingegen, wurden die Alkene zuerst über eine asymmetrische Dihydroxylierung [2] in die entsprechenden Diole **329** überführt, die wiederum über eine stereoselektive S_N-Reaktion nach Sharpless [1] in ihre Epoxide **328** überführt wurden. Das unten gezeigte Synthesekonzept gewährleistet eine höchstmögliche Flexibilität zur schnellen Gewinnung trisubstituierter Alkene, Diole und Epoxide als „Warheads“ für die Darstellung einer Inhibitorbibliothek.

4.2.4.2 Synthesekonzepte zur Darstellung der α -Ketosäureester

Die eingesetzten Aminosäuren, bzw. synthetischen Zwischenprodukte können aufgrund des breiten Spektrums nicht alle in diesem Abschnitt aufgeführt werden (s. Experimenteller Teil). Die verwendeten Aminosäuren, sowie die dargestellten Verbindungen werden in funktionellen Gruppen zusammengefasst. Genauere Details zu den jeweiligen Verbindungen und deren Struktur sind im experimentellen Teil dieser Arbeit nachzulesen. Für ein besseres Verständnis werden die synthetisierten Verbindungen nicht nach der IUPAC-Nomenklatur angegeben, sondern die Substanzen werden anhand ihrer Stoffklassen wie z.B. Hydroxy-, Keto-, Alken-, Diol-, Epoxy-, und ihre Seitenketten (Substitutionsmuster) nach der Aminosäure ihres Ursprungs benannt. Ein Beispiel für die eigens eingeführte Nomenklatur soll an Tyrosin kurz erläutert werden. Diazotierung von L-Tyrosin-OH \rightarrow Hydroxy-Tyr-OH; Oxidation von Hydroxy-Tyr-OH \rightarrow Keto-Tyr-OH; Veresterung \rightarrow Keto-Tyr-OMe, usw. Das Allgemeine Synthesekonzept ist in Abbildung 79 dargestellt. Die iterative Funktionalisierung, ausgehend

von kommerziell erhältlichen α -L-Aminosäuren beginnt mit einer Boc-Entschützung mittels TFA und DCM in Anwesenheit von TIPS (Scavenger), bei Raumtemperatur innerhalb 1 h, unter quantitativer Umsetzung.^[335] Auf die einzelnen Boc-entschützten Aminosäuren soll nicht eingegangen werden, da es sich hierbei um ein Standard-Protokoll handelt. Folgend wurden die Aminosäuren mittels enantioselektiver Diazotierung^[211] (s. Abschnitt 2.4) mit NaNO_2 in 0.5 M schwefelsaurer Lösung in die entsprechenden α -L-Hydroxysäuren **338-360** überführt. Die Synthesen der aliphatischen **338-341**, zyklischen **344-345** und aromatischen Hydroxysäuren **346-348** verliefen wie auch schon bei der Darstellung der α -D-Hydroxysäurenbibliothek (s. Abschnitt 4.1) problemlos. Mittels Umkristallisation in *n*-Hexan/Diethylether konnten die aliphatischen und aromatischen Hydroxysäuren in Ausbeuten >50% dargestellt werden.

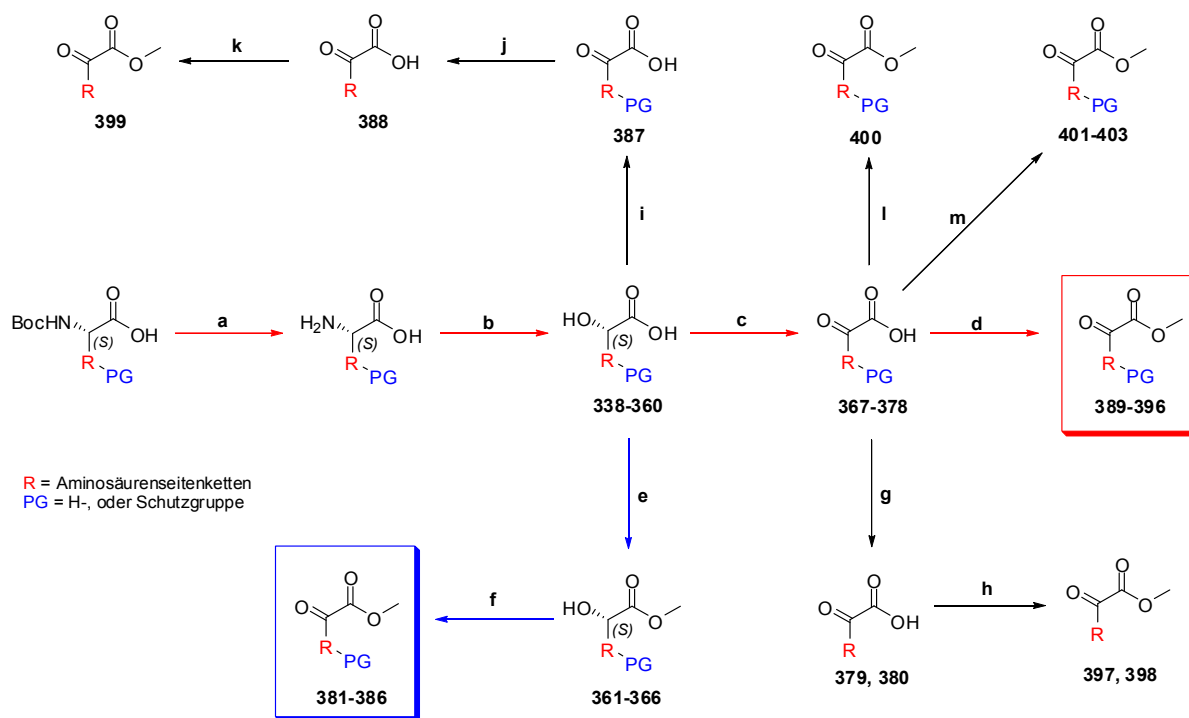


Abbildung 79: Synthesekonzept für die Darstellung von α -Ketosäureestern. a) TFA, TIPS, DCM, RT, 1 h, > 98 %; b) NaNO_2 , 0.5 M H_2SO_4 , H_2O , 0 °C \rightarrow RT, 24 h, > 50 %; c) PCC (2 ml %), H_5IO_6 , ACN, 0 °C, 2-4 h, > 50 %; d) TMSCl, MeOH, RT, 16 h, > 60 %; e) TMSCHN_2 , MeOH, 12 h, > 60 %; f) Dess-Martin-Periodinan, DCM, - 5 °C \rightarrow RT, 1-2 h, > 70%; g) Pd/C (10 %), H_2 , MeOH, 4 h, > 98 %; h) TMSCl, MeOH, RT, 16 h, > 80 %; i) Dess-Martin-Periodinan, DCM, - 5 °C \rightarrow RT, 1 h, 67 %; j) $\text{PheMe}_2\text{SiLi}$, THF, 0 °C, 6 h, 78 %; k) TMSCl, MeOH, RT, 16 h, 76 %; l) TMSCHN_2 , MeOH, 12 h, 91 %; m) Moc_2O , DMAP, THF, RT, 12 h, > 60 %.

Bei der Umsetzung der β -halogenierten Verbindungen **342**, **343** musste die Flussrate der Natriumnitrit-Lösung von 2ml/h auf 1/ml herabgesetzt werden, da es bei Flussraten über 1ml/h zu unerwünschten Nebenreaktionen kam. Die β -halogenierten Verbindungen wurden mit Ausbeuten von 75% (**342**) und 69% (**343**) dargestellt. Auch die seitenkettengeschützten Derivate **349-353** waren weitestgehend ohne Modifikation des Syntheseprotokolls zugänglich. Eigens die Umsetzung von H_2N -Tyrosin(OBzl)-OH in 0.5 M Schwefelsäure, erforderte eine Anpassung des Syntheseprotokolls. Aufgrund der hydrophoben Seitenkette wurde der Reaktionslösung tropfenweise THF als Lösungsvermittler zugesetzt und auf 40 °C im Wasserbad erwärmt. Die Natriumnitrit-Lösung wurde bei Raumtemperatur und nicht wie gewöhnlich bei 0 °C zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, nach erfolgter Aufarbeitung und Umkristallisation in *n*-Hexan/EtOAc konnte HO-Tyrosin(OBzl)-OH **349** in einer Ausbeute von 65% erhalten werden. Ein Problem bei der Darstellung von HO-Aspartat(OBzl)-OH (**352**) bzw. HO-Glutamat(OBzl)-OH (**353**) ist die schon erwähnte Lactonbildung von Hydroxycarbonsäuren. γ - und δ -Hydroxycarbonsäuren verestern in Anwesenheit katalytischer Mengen Säure sehr leicht intramolekular; wodurch sie in fünfgliedrige γ -Lactone bzw. sechsgliedrige δ -Lactone übergehen (s. Abschnitt 4.1). Die intramolekulare Lactonisierung konnte bei den Hydroxysäure **352** bzw. **353** nur in einem gewissen Umfang beobachtet werden, so dass beide Derivate **352** und **353** mit Ausbeuten > 50 % dargestellt werden konnten.

Für die Darstellung der heterozyklischen Hydroxysäuren **354-358** wurden unterschiedliche Schutzgruppen eingesetzt. Für die Umsetzung der α -Hydroxy-Trp-Derivate wurde die Indolseitenkette tosyl- (**354**) oder mesitylengeschützt (**355**) eingesetzt. Beide Schutzgruppen waren unter den stark sauren Reaktionsbedingungen nur bedingt stabil, so dass die Trp-Derivate **354** und **355** nur in geringen Ausbeuten (45% bzw. 51%) erhalten wurden. Diazotierungsstudien mit H_2N -Trp(Bzl)-OH (nicht gezeigt) führten zu keiner verbesserten Umsetzung. Die Tatsache, dass Imindazole unter stark sauren Bedingungen zu unerwünschten Nebenreaktionen neigen, erschwerte die Darstellung der Hydroxy-Histidine **356-358**. Auch eine Variation der Schutzgruppen von Tosyl- (**356**), über DNP-(**357**) bis hin zu Benzyl- (**358**) führte zu keinen großen Verbesserungen bei der Ausbeute der Histidin-Derivate. Das beste Ergebnis konnte mit der tosylgeschützten Verbindung **356** erzielt werden, wobei sich noch zeigen wird, dass der Histidinbaustein ein undankbares Substrat für die folgenden Reaktionen darstellte. Die Neigung der Aminosäure Cystein, zu oxidativen Nebenreaktionen, war neben den Problemen der Umkristallisation die hauptsächliche Ursache für die geringen Ausbeuten bei der Darstellung des HO-Cys-Derivats **359**. Während der Diazotierung von H_2N -Lys(2-Cl-Z)-OH kam es zur Abspaltung der Schutzgruppe, was zu einer Diazotierung der basischen Seitenkette, unter Verlust der Aminofunktion führte, und somit die Ausbeute von 22 % für HO-Lys(2-Cl-Z)-OH **360** erklärt. Die verwendete Methode für

die enantioselektive Diazotierung von α -L-Aminosäuren lässt sich Aufgrund der stark sauren Reaktionsbedingungen am besten auf aliphatische, zyklische und aromatische Aminosäuren anwenden. Bei der Umsetzung von seitenkettenfunktionalisierten Aminosäuren wie z.B. Ser, Tyr, His, Lys, muss auf die Wahl einer geeigneten Schutzgruppe geachtet werden. Die Synthese der basischen Hydroxysäuren stellt eine besondere Herausforderung dar, da sie aufgrund des zusätzlichen Elektronenpaares am Stickstoff zu unerwünschten Nebenreaktion unter sauren Reaktionsbedingungen neigen. Eine einfache Schützung des Stickstoffs von Lys, oder Arg ist nicht ausreichend, wobei z.B. eine zweifache Benzilylierung den sterischen Anspruch der Seitenkette von Lys so stark erhöht, dass sich eine weitere Umsetzung des dibenzylierten Substrats als unmöglich herausstellte (nicht gezeigt). Für die Umsetzung basischer Aminosäuren muss entweder die Schutzgruppenstrategie neu überdacht werden, oder die gewünschte basische Funktionalität muss zu einem späteren Zeitpunkt der Synthese eingeführt werden.

Die weitere Umsetzung der Hydroxysäuren erfolgt hauptsächlich über zwei unterschiedliche Wege. Über den ersten Weg (Abbildung 79, rot dargestellt) wurden die Hydroxysäuren **338-342**, **345-349**, **351** und **352** mittels PCC/Periodsäure in Acetonitril, bei 0 °C über einen Zeitraum von 2 - 4 h in die entsprechenden Ketosäuren **367-378** überführt. Nachdem zahlreiche Oxidationsversuche der aliphatischen Hydroxysäuren **338-343** mittels Swern-,^[218,351] IBX-,^[217,352] PCC-,^[353] PDC-,^[354] und TEMPO-Oxidation^[355] scheiterten, stellt sich die publizierte Oxidation nach Mo Hunsen *et al.*^[214] mittels PCC/Periodsäure als die Methode der Wahl heraus. Mit PCC (2 mol %) und Periodsäure in Acetonitril, konnten bei 0 °C die aliphatischen **367-370**, β -halogenierten **371**, zyklischen **372**, sowie die aromatischen **373-375** und die geschützten Ketosäuren **376** in guten bis sehr guten Ausbeuten >70% dargestellt werden. Nur die Oxidation von HO-Tyrosin(OBzl)-OH **377** und HO-Asp(OBzl)-OH **378** ergab unzureichende Ausbeuten von 30% und 47%, was auf eine partielle Abspaltung der Schutzgruppen oder auf eine mögliche Fragmentierung unter Bildung eines Benzaldehyds zurückgeführt wird. Teile der dargestellten Verbindungen Keto-Asp(OBzl)-OH **378** und Keto-Tyr(OBzl)-OH **377** wurden mit Palladium auf Aktivkohle (Pd/C (10%)) in MeOH unter Zusatz von Ameisensäure quantitativ seitenkettenentschützt, um eine weitere Umsetzung ohne Schutzgruppe zu testen.

Die mittels PCC/Periodsäure umgesetzten Ketosäuren konnten meistens ohne weitere Aufreinigung, wie in Abbildung 80 an einem Beispiel zu sehen ist, weiter umgesetzt werden. Daraufgehend wurden die Ketosäuren **367-378** mit TMSCI in Methanol unter Schutzgasatmosphäre (Argon), bei Raumtemperatur in die entsprechenden Ketosäureester **389-396** überführt. Da es bekanntlich bei einer Umsetzung mit TMSCI durch Freisetzung von HCl zu sauren Reaktionsbedingungen kommt war die Methode mittels TMSCI für die Darstellung der seitenkettengeschützten Ketosäureester-Derivate ungeeignet.

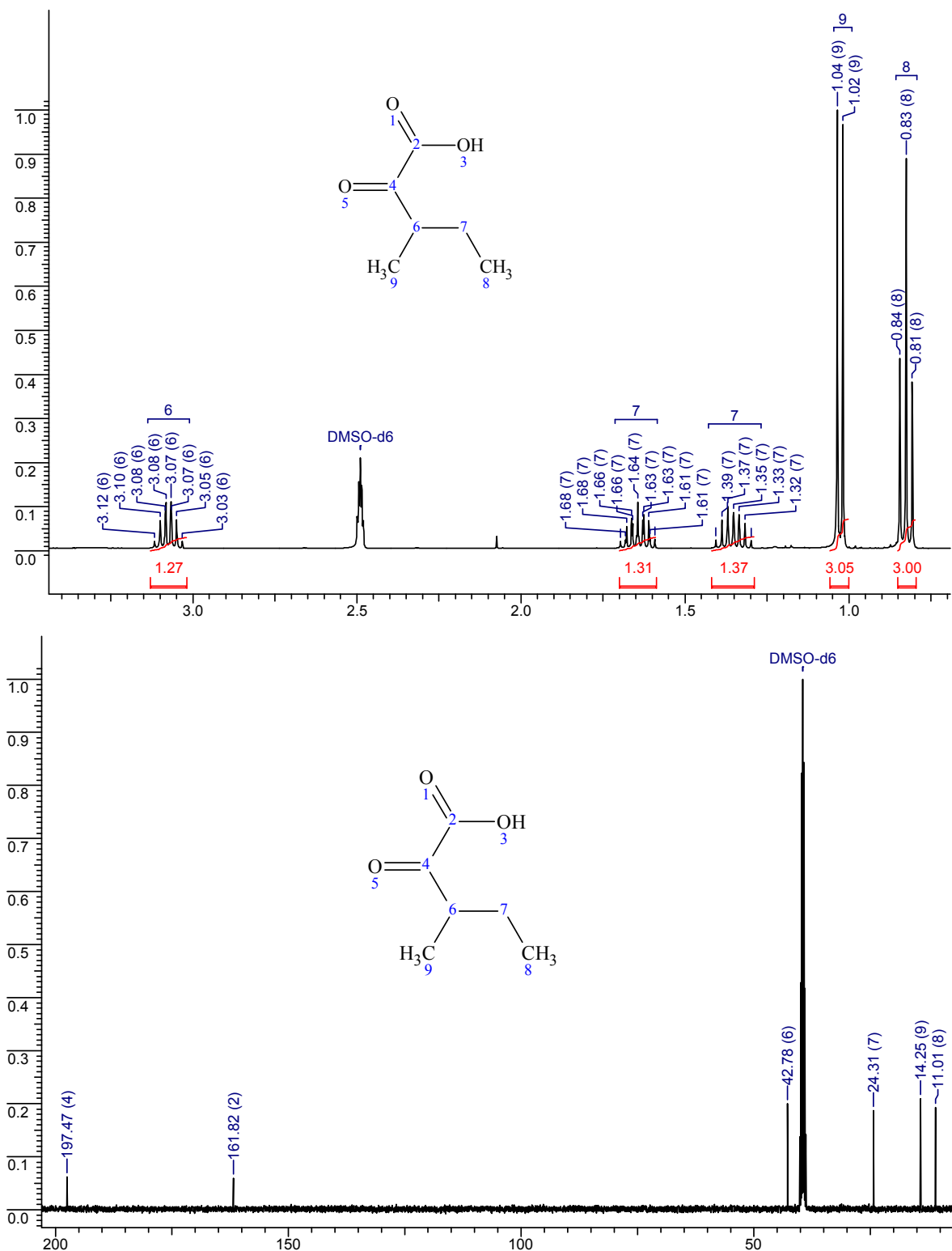


Abbildung 80: Zeigt exemplarisch Ausschnitte der ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von Keto-Ile-OH (**369**) in DMSO-d₆ (2.49 bzw. 39.5 ppm). Das Spektrum zeigt die Ketosäure **369** nach wässriger Aufarbeitung ohne anschließende chromatographische Aufreinigung. Bei Betrachtung der Signale im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum, erkennt man deutlich, dass kein Edukt bzw. unerwünschte Verunreinigungen mehr vorliegen.

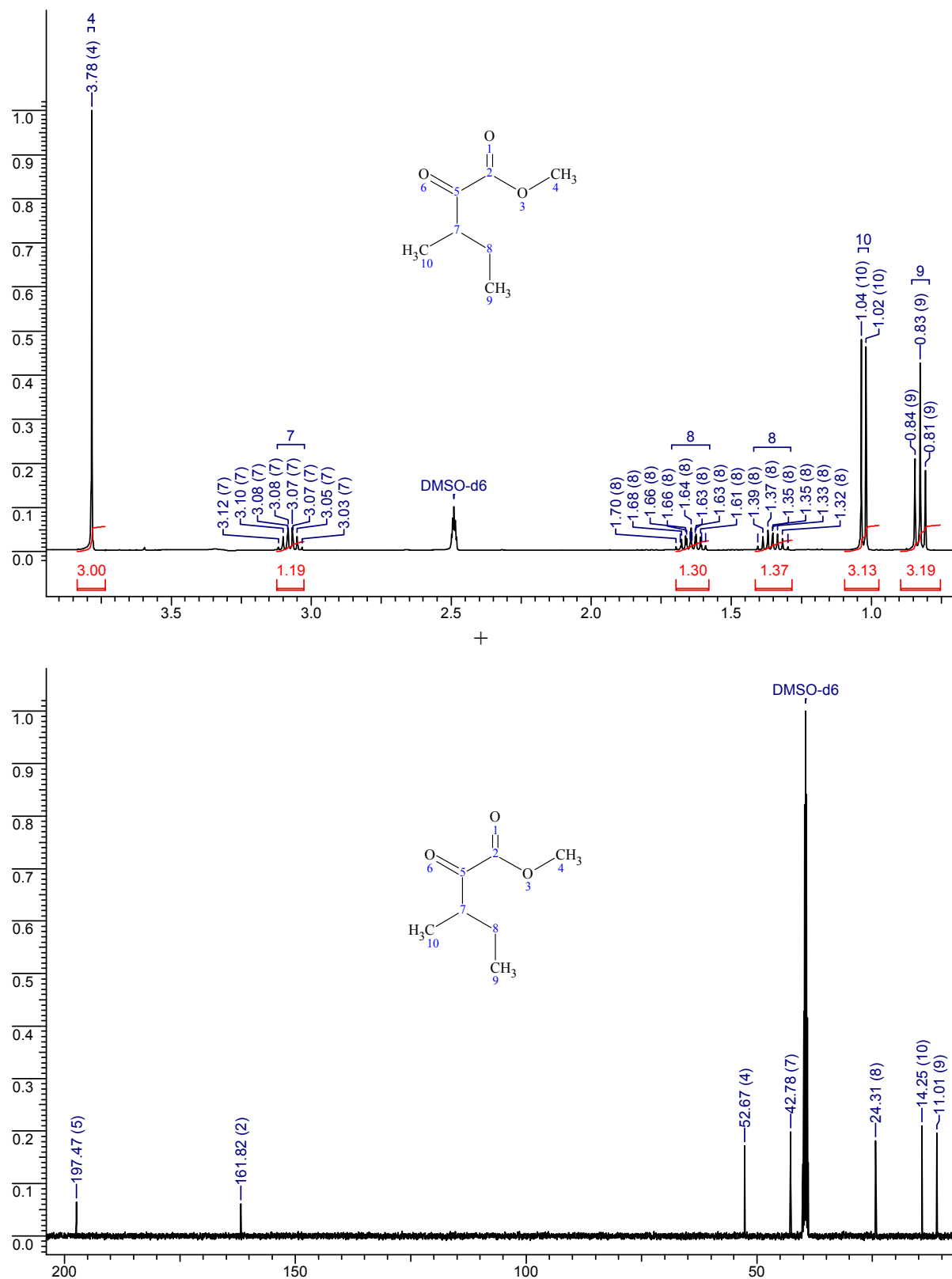


Abbildung 81: Zeigt exemplarisch Ausschnitte der ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von Keto-Ile-OMe (**391**) in DMSO-d₆ (2.49 bzw. 39.5 ppm). Die Spektren zeigen **391** nach erfolgreicher säulenchromatographischer Aufreinigung mittels *n*-Hexan/EtOAc.

Aufgrund des sauren Milieus in Methanol kommt es bei den benzylseitenkettengeschützten Ketosäuren **376-378** zu Umesterungs- bzw. Umetherungsreaktionen, wodurch die notwendige Orthogonalität der Schutzgruppen verloren geht und sie für eine weitere Umsetzung unbrauchbar macht. Unter diesem Aspekt wurde die Darstellung der Ketosäureester mit TMSCl in Methanol nur für die aliphatischen **389-393**, zyklischen **394** und aromatischen Derivate **395**, **396** verwendet. In Abbildung 81 sind exemplarisch die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von Keto-Ile-OMe (**391**) nach säulenchromatographischer Reinigung abgebildet. Das seitenkettengeschützte Keto-Thr(OBzl)-OH **376** wurden mit TMSCHN_2 in Methanol unter neutralen Reaktionsbedingungen in den entsprechenden Ketosäureester **400** mit einer Ausbeute von 92% überführt. Die neutralen Reaktionsbedingungen, machen TMSCHN_2 zu einem interessanten Reagenz für die Darstellung von Methylestern, doch die notwendigen Überschüsse von bis zu 80 eq, und der hohe Preis mindern eine breite Anwendbarkeit auf eine Vielzahl von Substraten. Keto-Trp(Tos)-OH **387**, Keto-Asp(OBzl)-OH **378** und Keto-Tyr(OBzl)-OH **377**, wurden über eine basenkatalysierte Reaktion eines Dicarbonats, mittels Moc_2O und DMAP, in THF bei Raumtemperatur innerhalb von 12 h in die entsprechend Ketosäureester **401-403** mit zufriedenstellenden Ausbeuten >60% umgesetzt (s. Abbildung 79). Eine Veresterung über diesen Mechanismus ist nur mit α -Ketosäuren möglich, da die Carbonylgruppe in direkter Nachbarschaft zur Carboxygruppe unterstützen auf deren Deprotonierung, und späteren Stabilisierung der negativen Ladung einwirkt.

Der zweite Weg (blau dargestellt, Abbildung 79) wurde hauptsächlich aufgrund unzureichender Oxidationsausbeuten der seitenkettengeschützten Hydroxysäuren **349-354** mit PCC/Periodsäure gewählt. Um eine Verbesserung der Oxidation für die seitengeschützten Derivate zu erzielen, wurde zuerst die Carboxyfunktion mittels TMSCHN_2 in Methanol unter neutralen Bedingungen verestert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit *n*-Hexan/EtOAc wurden die α -Hydroxysäuremethylester **361-366** in zufriedenstellenden Ausbeuten von >70% erhalten. Folgend wurden die α -Hydroxysäuremethylester **361-366** schonend mit Periodinan (Dess-Martin-Reagenz) in DCM, über einen Zeitraum von 1-2 h zu den entsprechenden Ketosäureestern **381-386** oxidiert. Eine Oxidation der α -Hydroxysäuremethylester mit PCC/Periodsäure unter sauren Bedingungen, konnte aufgrund der erwähnten sauren Bedingungen, und den daraus resultierenden Umesterungsreaktionen nicht erfolgen. Die publizierte Oxidation mit Periodinan^[219,220] in DCM erschien für die geschützten Derivate **361-366** am besten geeignet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (*n*-Hexan/EtOAc) wurden die Ketosäureester **381-385** in Ausbeuten >60% erhalten. Die Oxidation von Keto-Trp(Mts)-OMe **386** in einer Ausbeute von nur 43% lag weit unter den Erwartungen. Abschließend sollen zwei Nebenwege zur Darstellung der Ketosäureester Derivate **399**, **397**, **398** erwähnt werden.

Aufgrund der unzureichenden Umsetzung von HO-Trp(Tos)-OH **354** mit PCC/Periodsäure, wurde eine Oxidation mittels Dess-Martin-Reagenz in DCM getestet. Die erhaltene Ketosäure **388** wurde folgend zuerst mit Phenyltrimethylsilyllithium in THF bei 0 °C innerhalb von 3 h tosylentschützt, und anschließend mittels TMSCl in Methanol in das entsprechenden Keto-Trp(NH)-OMe-Derivat **399** überführt. Die Abspaltung der Tosylschutzgruppe zu diesem Zeitpunkt erfolgte zum einen zwecks einer möglichen Umschüttung der Indolseitenkette, als auch für eine weitere Umsetzung des Bausteins ohne Schutzgruppe. Die zu Anfangs erwähnte Hydrogenolyse der Ketosäuren **377** und **378** mit Palladium auf Aktivkohle (Pd/C (10%)) wurde zu Testzwecken durchgeführt, und sollte für die weiteren Umsetzungen den sterischen Anspruch dieser Verbindungen reduzieren. Folgend wurden Teile der Ketosäuren **379** und **380** mit TMSCl in Methanol zu den entsprechenden Ketosäureester **397**, **398** umgesetzt.

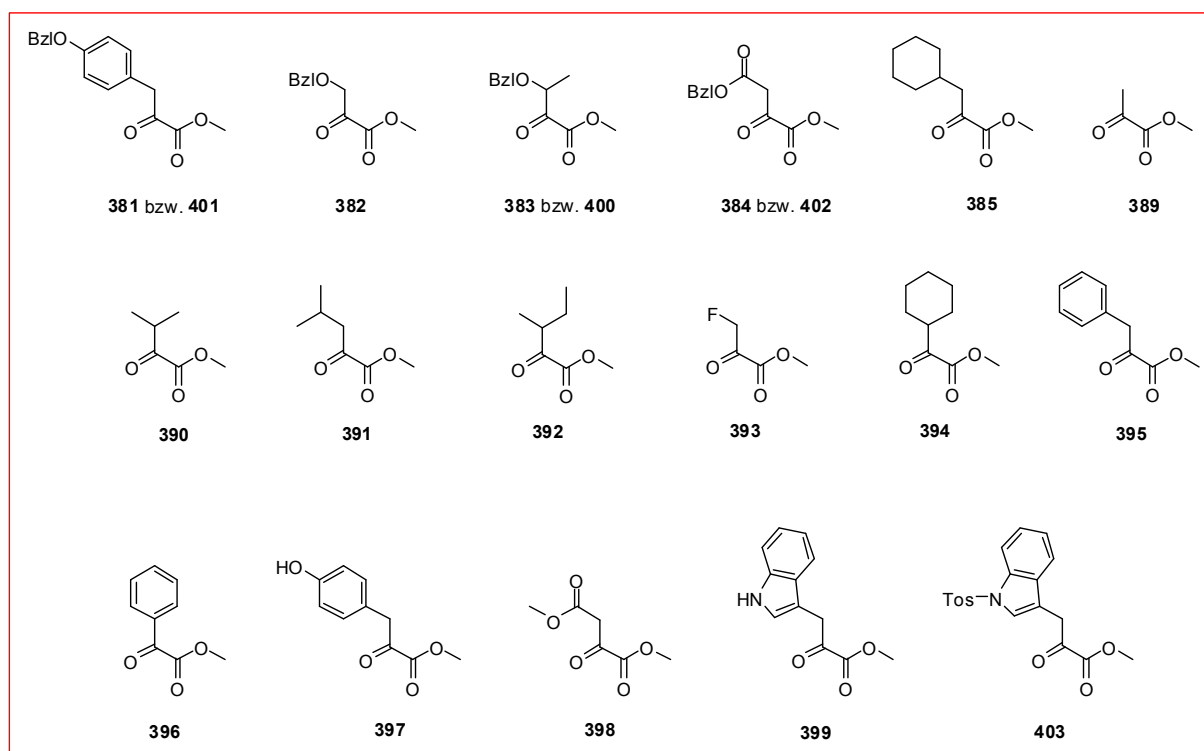


Abbildung 82: Strukturen der für die Wittig- oder Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion eingesetzten α -Ketosäureester.

In Abbildung 82 sind die für die im folgenden Abschnitt behandelten Olefinierungsreaktionen mittels der Wittig- oder Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktionen eingesetzten α -Ketosäuremethylester gesondert aufgeführt. Die angeführten Probleme bei der Darstellung basischer Derivate wie z.B. Lys, Arg oder His, machten deren Einsatz in einer Olefinierungsreaktion zum gegenwärtigen Zeitpunkt unmöglich. Unter Berücksichtigung dieser Begrenzung

konnten ausschließlich aliphatische (**389**, **390**, **391**, **392**), halogenierte (**393**), zyklische (**385**, **394**), aromatische (**395**, **396**), polare (**381**, **382**, **383**, **397**), ionische (**384**, **398**) und heterozyklische (**399**, **403**) Ketosäureester für die folgenden Olefinierungen eingesetzt werden. Nebenbei möchte ich noch erwähnen, dass auf eine weitere Umsetzung der α -Hydroxysäure HO-Cys(Bzl)-OH (**359**) aufgrund möglicher unerwünschter Nebenreaktionen mit den finalen elektrophilen Bausteinen (Alken, Epoxid) verzichtet wurde.

4.2.4.3 *E*- und *Z*-Selektive Olefinierungsreaktionen für die Darstellung der trisubstituierten *E*- bzw. *Z*-Alkene

Neben den Dreiring-Heterocyclen stellen auch Akzeptor-substituierte, *E*-konfigurierte Olefine potentielle Bausteine für Cysteinprotease-Inhibitoren dar. Der Aufbau von Doppelbindungen durch C-C-Knüpfungsreaktionen ist ein elementarer Schritt zur Synthese komplexer Molekülstrukturen, nicht zuletzt deshalb, weil aus Alkenen durch diverse Funktionalisierung ein breites Spektrum wichtiger Substrate generiert werden kann. Neben zahlreichen Varianten der Alkensynthese sind die Wittig-^[221-223] als auch die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion^[224-228,356] bedeutende Umsetzungen für die Darstellung dieser Substanzklasse (s. Abschnitt 2.4.3 und 2.4.4). Für die synthetisierten Ketosäureester (s. Abbildung 82) gab es bisher keine publizierten Wittig- oder HWE-Protokolle zur selektiven Darstellung von (*E*)- bzw. (*Z*)-Alkenen. Auf der Suche nach einem geeigneten Olefinierungsprotokoll für die Darstellung trisubstituierter Alkene stieß ich auf die Publikationen von Sano *et al.*^[230,234,357,358] die einen *E*- bzw. *Z*-selektiven Zugang mittels einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion beschreiben. Erste Synthesestudien zur Umsetzung der Ketosäureester **389-396** mit der nach Sano *et al.* publizierten HWE-Reaktionen ergab leider, dass eine selektive Darstellung der gewünschten (*E*)-Alkene nicht möglich ist, jedoch aber die der (*Z*)-Alkene. Aufgrund einer beschränkten Überführung der eingesetzten Ketosäureester in die entsprechenden (*E*)-Alkene und oftmals unzureichender *E/Z*-Selektivität wurde die Umsetzung mit der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktionen für die Synthese der trisubstituierten (*E*)-Alkene verworfen. Erst die von Price *et al.* publizierte *E*-selektive Wittig-Reaktion mittels unterschiedlicher Ketosäureester und einem stabilisierten Ylid,^[359] schien aufgrund der Ähnlichkeit der von Price verwendeten Ketosäureestern und den von mir synthetisierten α -Ketosäuremethylestern eine vielversprechend Methode zu sein. Synthesestudien zu der von Price *et al.* publizierten Methode ergab, dass die synthetisierten α -Ketosäureester **382-403** selektiv in die entsprechenden (*E*)-Alkene umgesetzt werden konnten. Die selektive Darstellung der (*Z*)-Alkene konnte weiterhin über eine HWE-Reaktion erfolgen.^[357,358] Die für die *E*- bzw. *Z*-selektiven Wittig- oder HWE-Reaktion notwendigen Reagenzien, wie das stabilisierte Ylid^[360] (**438**) und die stabilisierten Carboanionen^[361,362] (**439-440**) wurden über eine maximal

dreistufige Synthese nach den Publikationen von Ghiglieri-Bertez *et al.* bzw. Broady *et al.* dargestellt. Die Umsetzung der Ketosäuremethylester in einer Wittig-Reaktion (Abbildung 83) erfolgte durch die langsame Zugabe von *tert*-Butoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (**438**) (Flussrate 1ml/h) in THF bei 0 °C. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktionslösung für weitere 5 h bei 0 °C gerührt und danach langsam auf Raumtemperatur (5 °C/h) gebracht. Durch Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck und anschließender säulenchromatographischer Reinigung mittels *n*-Hexan/Ethylacetat konnten die entsprechenden (*E*)-Alkene in hoher Selektivität von bis zu 99% erhalten werden. Die langsame Zugabe des Ylids **438** ist essentiell für die *E*-selektive Umsetzung der Ketosäureester in die entsprechenden (*E*)-Alkene, besonders bei den sterisch anspruchsvolleren Ketosäuremethylestern wie z.B. **403**, **381**, **402**, **383** und **400** wurde die Flussrate auf 0.5 ml/h reduziert. Die aliphatischen **404-407**, aromatischen **408-409** und zyklischen (*E*)-Alkene **410-411** wurden in Ausbeuten von 86 – 95% erhalten. Bei den genannten Verbindungen **404-411** konnte weder die Bildung des unerwünschten *Z*-Isomers beobachtet bzw. nach säulenchromatographischer Aufreinigung isoliert werden.

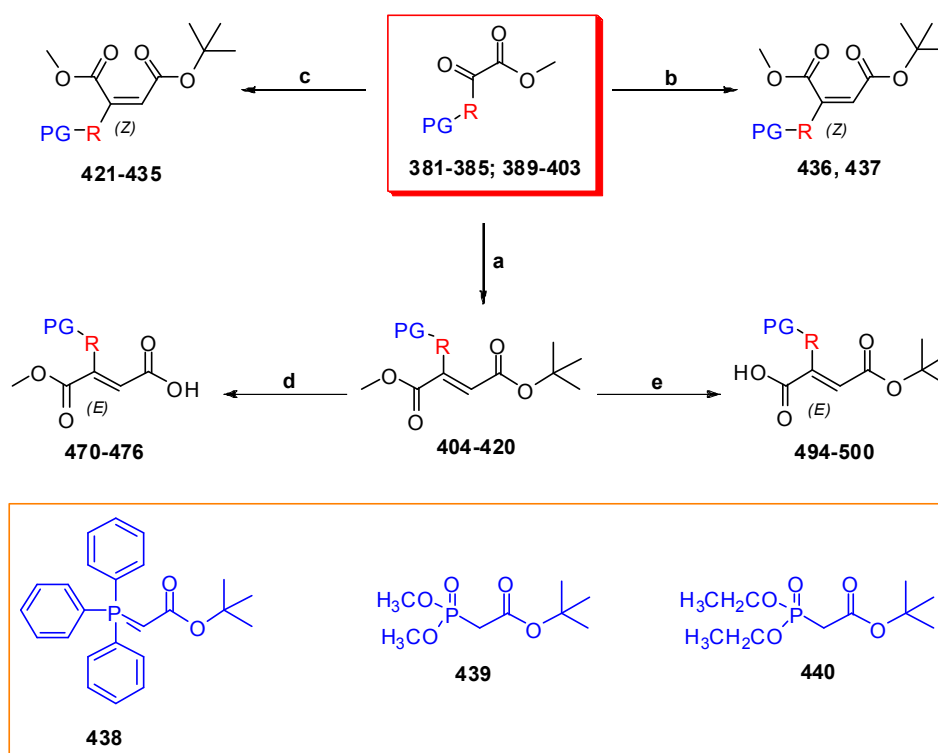
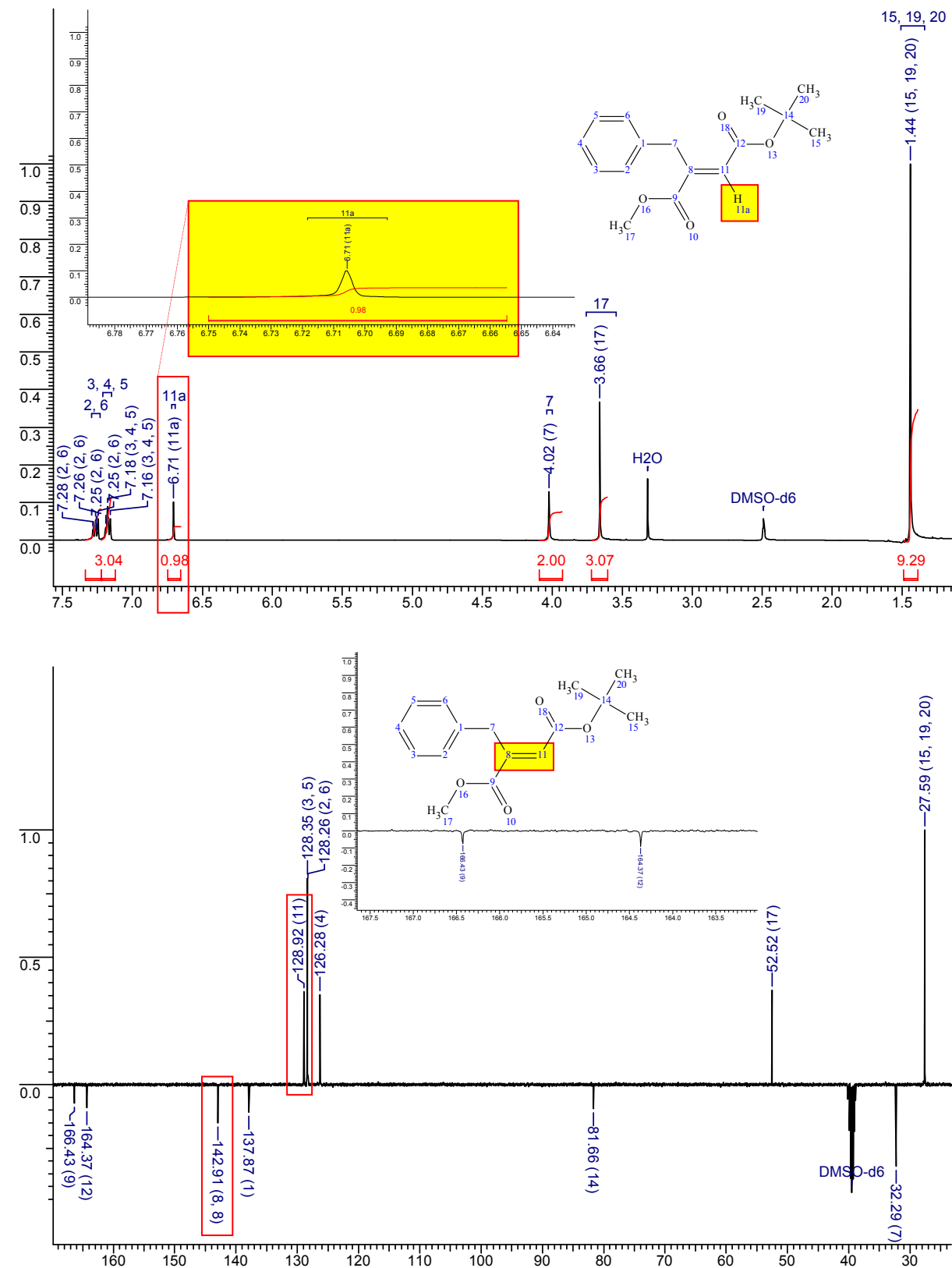


Abbildung 83: Schema der verwendeten Wittig- und HWE-Reaktionen; a) *tert*-Butoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (**438**), THF, 0 °C → RT, 24 h, >70%; b) *tert*-Butyl-*P,P*-dimethylphosphonoacetat (**439**), NaH, THF, 0 °C, 24 h, >70%; c) *tert*-Butyl-[bis(2,2,2-trifluorethoxy)phosphono]acetat (**440**), Sn(OSO₂CF₃)₂, *N*-Ethylpiperidin, DCM, 0 °C, 4 h, >70%; d) TFA, DCM, TIPS, RT, 2 h, >90%; e) LiOH (0.5 M), THF, 0 °C, 2 h, >80%.

Bei der Umsetzung von Keto- β -Fluor-Ala-OMe **393** in das entsprechende (*E*)-Alken **412** wurde ausschließlich das *E*-Isomer gebildet. Die Ausbeute von **412** betrug nur 48% und blieb weit hinter den Erwartungen zurück. Die Instabilität des Keto-Fluor-Derivats (**393**) als auch dessen starker -I-Effekt stellen eine mögliche Ursache für die verringerte Umsetzung dar. Bei der Darstellung der seitenkettengeschützten Ser- bzw. Thr-Derivate (**413**, **414**,) kam es zu einer geringfügigen Bildung des unerwünschten *Z*-Isomers, das mittels einer Kieselgelsäule einfach abgetrennt werden konnten. Die Bildung der *Z*-Isomere, war jedoch so gering, dass sie weder isoliert noch quantifiziert werden konnten. Die Ausbeuten für die Verbindungen **413** (41%) und **414** (61 %) lagen unter dem Erwartungswert.

Optimierungsversuche hinsichtlich der Reaktionsbedingungen führten zu keiner verbesserten Umsetzung der Derivate (**413**, **414**). Die Asp-Derivate (**415**, **416**) ließen sich gut bis sehr gut darstellen. Auffällig bei der Umsetzung der beiden Derivate war, dass das Asp-Derivat **416** sich in einer Ausbeute von bis zu 95% synthetisieren ließ, wohingegen das Asp-Derivat **415** nur in Ausbeuten von 71% erhalten wurde. Da sich beide Verbindungen nur anhand ihrer Seitenkettenschutzgruppen **415** (OBzl), **416** (OMe), unterscheiden wurde die verminderte Ausbeute auf den sterischen Einfluss der Benzylschutzgruppe zurückgeführt. Die gleiche Problematik konnte auch bei den Tyr-Alkenen **417**, **418** sowie den Trp-Alkenen **419**, **420** beobachtet werden. Die Tyr-Verbindung **417** war benzylgeschützt, wohingegen auf eine Schützung der phenolischen Hydroxyfunktion von **418** verzichtet wurde. Bei den Trp-Derivaten konnte das ungeschützte Derivat **420** mit einer Ausbeute von 71% gegenüber dem Tosyl-geschützten Derivat **419** von nur 41% darstellen werden. Die Darstellungen der (*E*)-Alkene mit der Wittig-Reaktion verliefen weitestgehend ohne Bildung des unerwünschten *Z*-Isomers, das wenn nötig einfach infolge einer säulenchromatographischen Aufreinigung abtrennbar war.

Die ^1H -NMR-Spektren der synthetisierten Alkene wurden für die Bestimmung des *E*- oder *Z*-Isomers als auch für die Bestimmung der *E/Z*-Selektivität analog den Publikationen von Sano *et al.* bzw. Price *et al.* interpretiert.^[357-359,363,364] Charakteristisch für die dargestellten (*E*)-Alkene ist, dass Auftreten des Proton-Signals (Singulett) an der Doppelbindung zwischen 6.0 und 7.0 ppm, wohingegen das Proton an der Doppelbindung der (*Z*)-Alkene spezifisch zwischen 5.0 bis 5.8 ppm auftritt. Somit liegt bei einem direkten Vergleich der ^1H -NMR-Spektren des *E*- oder *Z*-isomeren Alkens das Signal des Doppelbindungsprotons des *Z*-Isomers im Vergleich zu den *E*-isomeren Alken immer tieffeldverschoben vor. Ein weiteres Charakteristikum ist, dass das Proton der (*Z*)-Alkene interessanterweise in ein Triplett, und das der (*E*)-Alkene als Singulett aufspaltet. Empirisch konnte für die synthetisierten Derivate zusätzlich eine direkte Unterscheidung des *E*- bzw. *Z*-Isomers auf Grundlage der ^{13}C -NMR-Spektren gefunden werden.



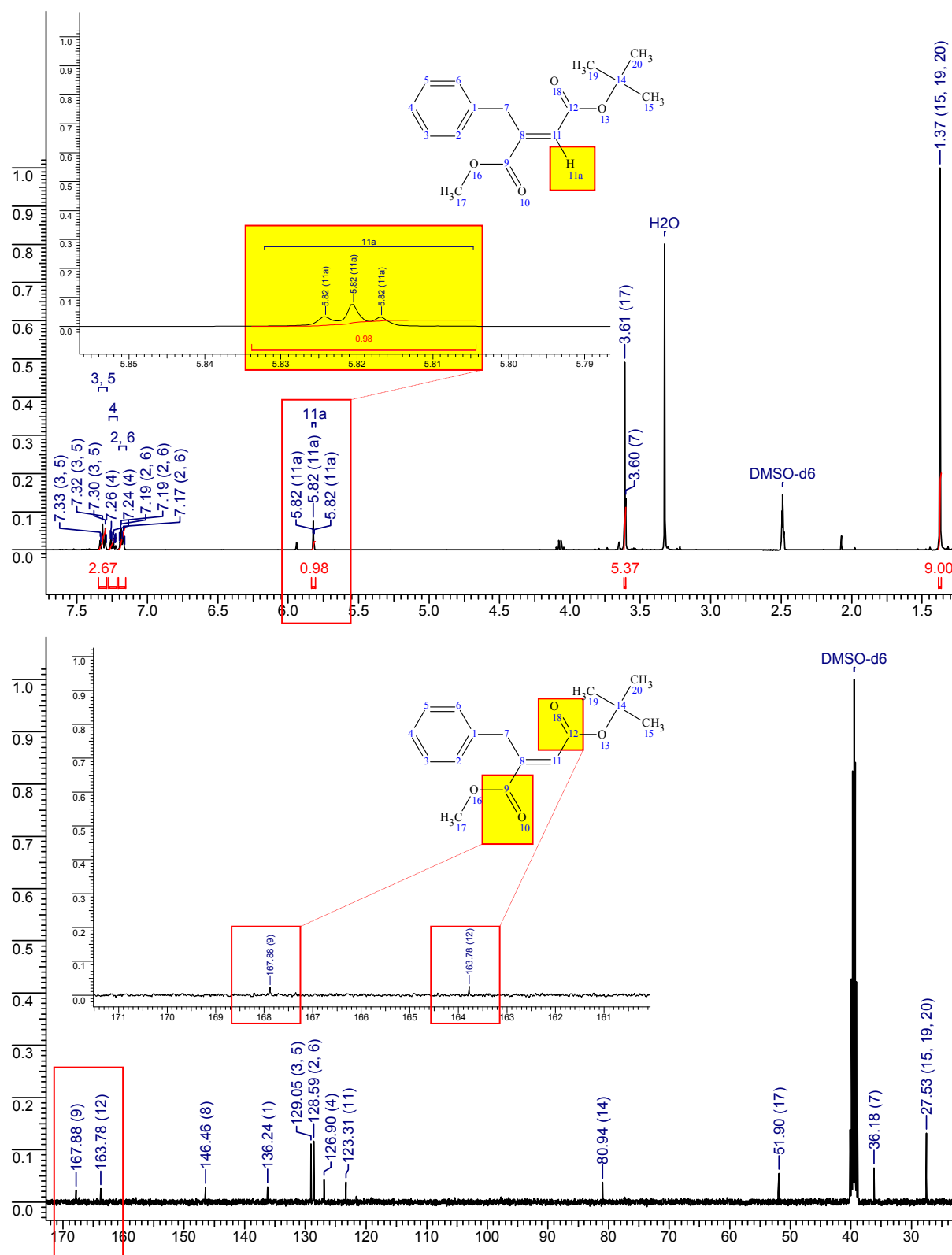


Abbildung 85: Ausschnitt aus dem ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von (Z)-Alken-Phe-OtBu **426** nach säulenchromatographischer Reinigung (*n*-Hexan/EtOAc) in DMSO-d₆ (2.49 bzw. 39.5 ppm). Im ¹H-Spektrum ist das Proton (Triplett) der Doppelbindung charakteristisch für Z-Alkene bei 5.82 ppm zu sehen. Die Signale der Carbonylgruppen liegen bei 163.8 und 167.9 ppm.

Die Signale der beiden Carbonylgruppen liegen bei den (*E*)-Alkenen maximal 2 ppm auseinander, wohingegen die Carbonylgruppen der (*Z*)-Alkene mindestens 4 ppm auseinander liegen. In Abbildung 84 und 85 sind die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von (*E*)- (**409**) bzw. (*Z*)-Alken-Phe-OtBu (**426**) zu sehen. Die Darstellung der (*Z*)-Alkene **421-435** erfolgte mit der HWE-Reaktion unter Einsatz von *tert*-Butyl-*P,P*-dimethylphosphonoacetat (**439**) und Natriumhydrid in THF bei 0 °C über einen Zeitraum von 3 h.^[359] Nach wässriger Aufarbeitung und azeotroper Destillation des Lösungsmittles wurden die (*Z*)-Alkene mit *n*-Hexan/Ethylacetat säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Synthese der aliphatischen **421-424**, aromatischen **425-426** sowie die zyklischen (*Z*)-Alkene **427-428** mit der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion verliefen ohne nennenswerte Komplikationen. Die Ausbeuten der aliphatischen, als auch der aromatischen (*Z*)-Alkene waren gegenüber den nach der Wittig-Reaktion dargestellten (*E*)-Alkenen etwas vermindert, wobei diese in hoher Selektivität dargestellt werden konnten (>99%). Die zyklischen (*Z*)-Alkene **427-428**, konnten wie auch schon bei der *E*-selektiven Umsetzung, in sehr guten Ausbeuten von 81% (**427**) und 84% (**428**) erhalten werden. Bei der Umsetzung von Keto- β -Fluor-Ala-OMe (**393**) zum entsprechenden (*Z*)-Alken **429** wurde zwar auch hier ausschließlich das *Z*-Isomer gebildet, wobei es aber auch unter diesen Reaktionsbedingungen zu dem schon erwähnten Problem der Instabilität kam. Bei der Darstellung der seitenkettengeschützten (*Z*)-Alkene **430-433** kam es partiell zur Bildung von *E*-Isomeren, wobei auch hier die unerwünschten *E*-Isomere chromatographisch abtrennbar waren. Die größere Problematik bei den Ketosäureestern (**382-384** bzw. **398**) war deren schlechte Umsetzung in die entsprechenden (*Z*)-Alkene **430-433** in Ausbeuten <50%. Der bereits mehrmals erwähnte sterische Einfluss der voluminösen Schutzgruppen spielt eine größere Rolle bei der *Z*-selektive Umsetzung mittels der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion als bei der *E*-selektiven Darstellung über die Wittig-Reaktion. Unter diesem Aspekt wurden zu Testzwecken, die (*Z*)-Alkene **434-435** ohne Schutzgruppe dargestellt. Aufgrund des ungeschützten Indol-Stickstoffs des Trp-Derivats **434** und der ungeschützten phenolischen Hydroxyfunktion des Tyr-Derivats **435** kam es mit dem eingesetzten Natriumhydrid zu unerwünschten Nebenreaktion, was die schlechten Ausbeuten von 37% (**434**) und 30% (**435**) erklärt. Aus diesen Gründen wurde eine weitere HWE-Methode für die Darstellung der seitenkettengeschützten (*Z*)-Alkene **436-437** getestet. Hierbei wurden die seitenkettengeschützten Ketosäureester **401** und **403** mit *tert*-Butyl-*bis*(2,2,2-trifluorethoxy)-phosphono]acetat (**440**), $\text{Sn}(\text{OSO}_2\text{CF}_3)_2$ und *N*-Ethylpiperidin in DCM in die entsprechenden (*Z*)-Alkene überführt.^[358] Durch den Einsatz von Zinntriflat, das den Carbonyl- und Phosphor-Sauerstoff des HWE-Reagenz chelatisiert und dadurch die Deprotonierung mittels *N*-Ethylpiperidin erleichtert, und den Übergangszustand stabilisieren sollte, führte leider nicht zu einer Verbesserung der Ausbeuten für die Verbindungen **436** (35%) und **437** (35%). Für die anschließenden peptidsynthetischen Kupplungen zur Dar-

stellung der (*E*)-Alken-Tripeptide, wurden ausschließlich von den (*E*)-Alken-„Warheads“, entweder der *tert*-Butylester- oder der Methylester entschützt. Die Verseifung der Methylester mittels 0.5 M Lithiumhydroxid-Lsg. in THF bei 0 °C verliefen für die o.g. Verbindungen nahezu quantitativ. Bei der Abspaltung der *tert*-Butylester mittels TFA/DCM in Anwesenheit von TIPS (Scavenger) kam es zu keinen unerwünschten Nebenreaktionen, und die entschützten Verbindungen konnten in Ausbeuten von bis zu 99% dargestellt werden. Die Aufarbeitungsprozeduren und das anschließende Ausfällen und Filtrieren der Verbindungen machte eine zusätzliche säulenchromatographische Aufreinigung unnötig. Die Verbindungen konnten in ausreichender Reinheit für die anschließenden Peptidkupplungen eingesetzt werden. Für die Kupplung der (*E*)-Alkene mit dem *E64c-like* Dipeptid (**321**) wurde der Methylester, und für die Kupplung mit dem *CA028-like* Dipeptid (**326**) der *tert*-Butylester verseift (s. Abschnitt 4.2.2). In Abbildung 86 und 87 sind die dargestellten (*E*)- bzw. (*Z*)-Alkene zur besseren Übersicht nochmals gesondert strukturell aufgeführt.

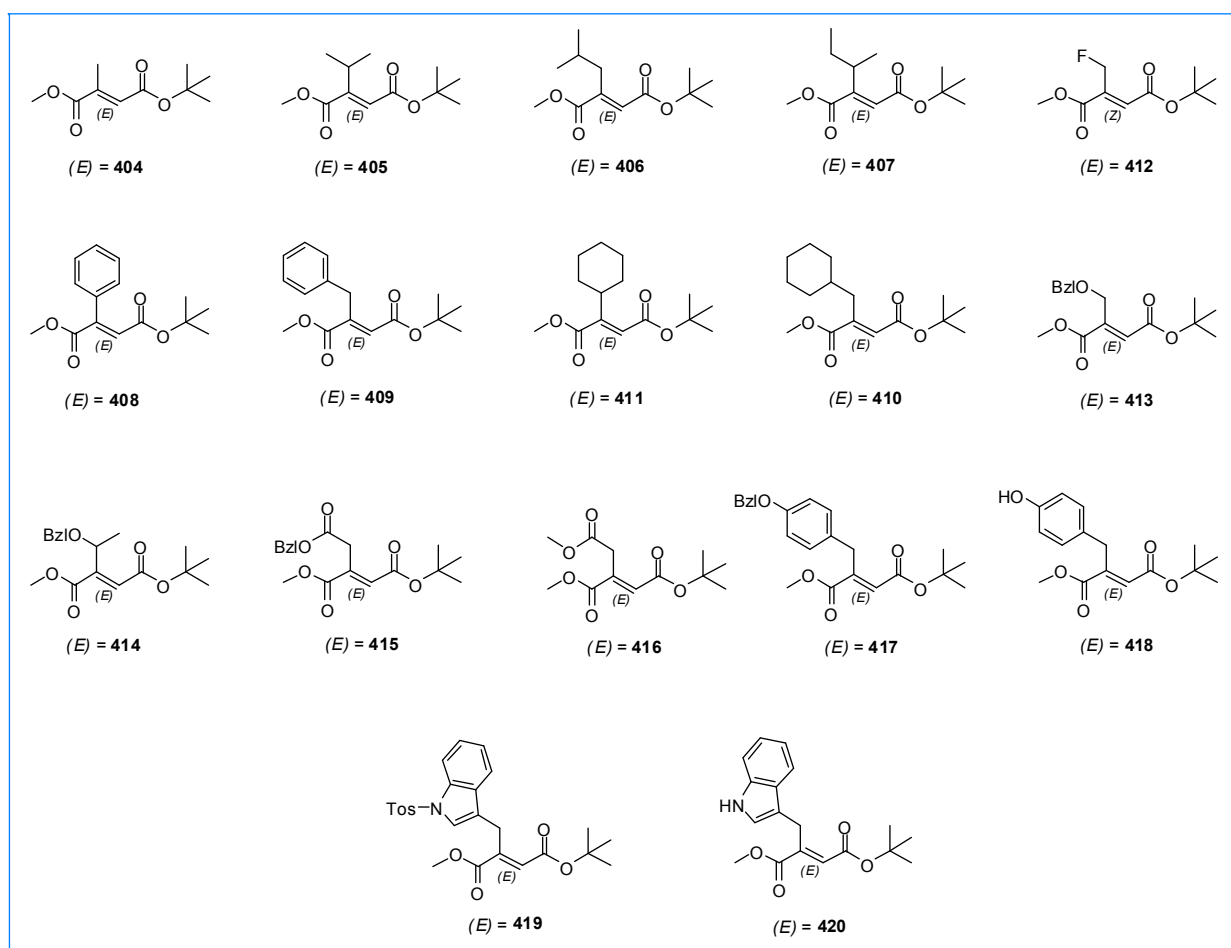


Abbildung 86: Strukturen der mittels der Wittig-Reaktion synthetisierten (*E*)-Alkene **404-420** für die anschließende Darstellung der (*E*)-Alken-Tripeptid-Inhibitoren bzw. deren Umsetzung zu den entsprechenden Diole- bzw. Epoxide.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die (*E*)-Alkene mittels der o.g. Wittig-Reaktion in hoher Selektivität dargestellt werden konnten. Ausschließlich bei der Darstellung der seitenkettengeschützten Derivate kam es partiell zur Bildung des unerwünschten *Z*-Isomers und dadurch zu einer Abnahme der Ausbeute. Somit lässt sich mit der angewandten Wittig-Methode ein breites Spektrum trisubstituierter (*E*)-Alkenen darstellen. Bei der *Z*-selektiven Umsetzung über die HWE-Reaktion zeigte sich eine stärkere Limitierung bezüglich der Toleranz sterisch anspruchsvoller Substitutionsmuster. Infolge eines vorgezogenen Screenings einzelner mit (*Z*)-Alken bestückter CA028-like-Tripeptide konnte gezeigt werden, dass die (*Z*)-konfigurierten Alkene gegenüber den papainähnlichen Cysteinproteasen nur eine geringe bis keine Aktivität aufweisen (nicht gezeigt). Unter diesem Aspekt wurde auf eine weitere Umsetzung der synthetisierten (*Z*)-Alken-Bausteine (**421-437**) zur Darstellung der Inhibitor-Bibliothek für die Testierung an papainähnlichen Cysteinproteasen abgesehen. Ein möglicher Einsatz für die Darstellung von Aspartyl-Protease-Inhibitoren, ist aufgrund der bevorzugten *cis*-Konfiguration für den nucleophilen Angriff der Aspartyl-Reste (katalytische Diade) nicht ausgeschlossen.

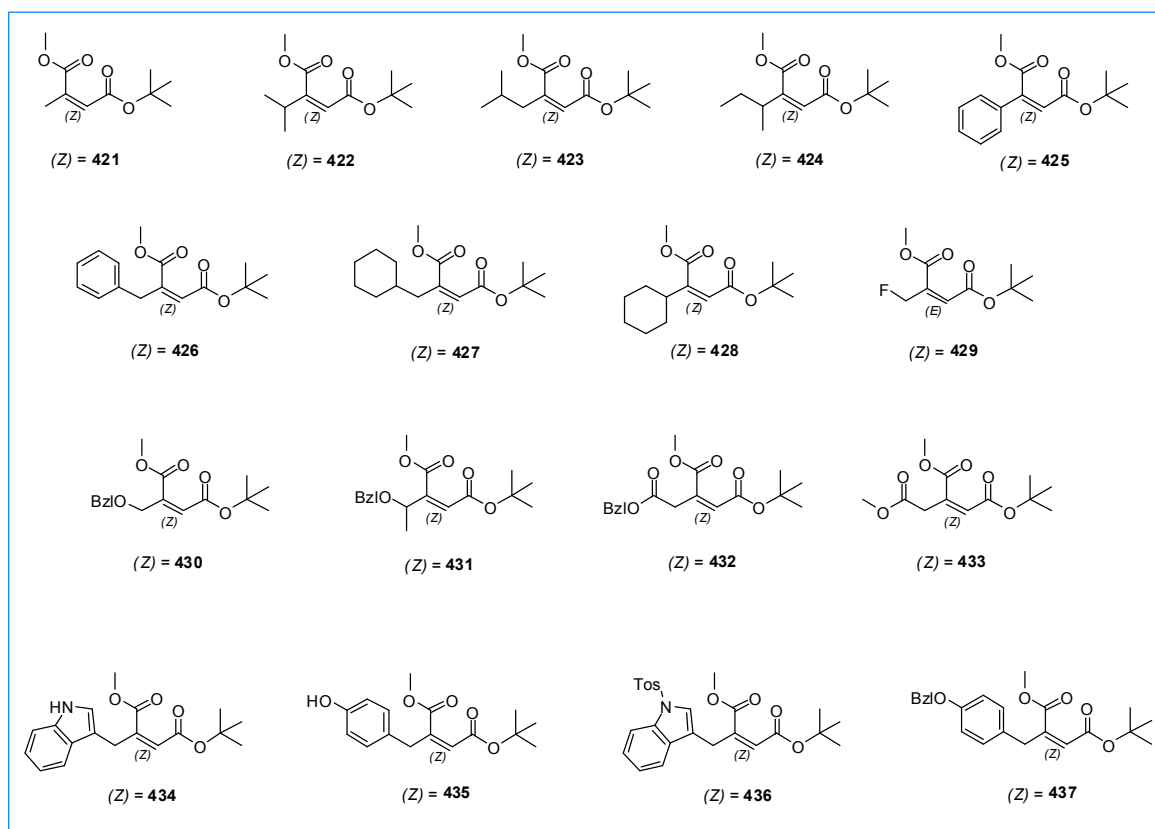


Abbildung 87: Strukturen der über die Horner-Wadsworth-Emmons-Methode dargestellten (*Z*)-Alkene **421-437**. Für die anschließende Umsetzung in die entsprechenden Diole bzw. Epoxide, oder einer später folgenden Darstellung von Aspartylprotease-Inhibitoren (nicht gezeigt).

4.2.4.4 Synthese der Diol- und Epoxid- „Warheads“

Ein großer Vorteil der Epoxysuccinate liegt in der Erhöhung der Elektrophilie des Rings, wodurch der Angriff von Nucleophilen erleichtert wird. Dieses Prinzip der Erhöhung der Reaktivität ist für die als Cysteinprotease-Inhibitoren fungierenden *trans*-Epoxysuccinate schon bewiesen.^[365] Ein weiterer Vorteil dieser Verbindungen ist eine mögliche Peptidkupplung an beiden Seiten des Dreirings. Synthetisch stellt die Darstellung von Epoxysuccinaten jedoch eine größere Herausforderung dar als die Synthese der Oxiran-2-carboxylate, da hierbei ein stark elektronenarmes Doppelbindungssystem epoxidiert werden muss. Versuche zur Epoxidierung von *trans*- bzw. *cis*-Alkenen mittels gängiger Epoxidierungsreagenzien, wie *meta*-Chlor-perbenzoesäure oder Wasserstoffperoxid lieferten am sehr elektronenarmen Doppelbindungssystem der Fumarate und Maleate erwartungsgemäß keinen Erfolg. Die literaturbeschriebenen Möglichkeiten zur direkten Epoxidierung mit Peroxytrifluoressigsäure,^[366,367] Dimethyldioxiran^[368] oder eine Übergangsmetallkatalysierte Jacobsen-Epoxidierung^[369] führten nicht zu den erhofften *trans*- bzw. *cis*-Epoxiden. Eine weitere Möglichkeit zur direkten Epoxidierung von elektronenarmen Doppelbindungssystemen unter Verwendung einer hochreaktiven fluorierten Sauerstoffspezies, die wiederum als Epoxidierungsreagenz agiert,^[370] wurde wegen des umfangreichen, gefährlichen und teuren apparativen Aufwands nicht durchgeführt. Auch die in der Literatur von Payne und Williams beschriebene Methode^[371] der direkten Epoxidierung von Maleinsäuren mittels Wasserstoffperoxid unter Natrium-Wolframat-Katalyse, und das modifizierte Protokoll nach Kirshenbaum und Sharpless^[372] lieferte nicht nur sehr schlechte Ausbeuten sondern auch immer ein nichttrennbares Gemisch aus *cis/trans*-Disäuren bzw. *cis/trans*-Dinatriumsalzen. Die Methode der Wahl zur direkten Epoxidierung der Fumar- bzw. Maleinsäureester stellte die von Moore *et al.* beschriebene Syntheseroute dar.^[245,246] Bei dieser Weitz-Schäffer-Epoxidierung fungiert das *in situ* gebildete Lithium-*tert*-butylhydroperoxid als Sauerstofftransfer-Reagenz und überführt die Fumar- bzw. Maleinsäureester in die entsprechenden Epoxysuccinate. Synthesestudien zu den dargestellten (*E*)- und (*Z*)-Alkenen mittels Lithium-*tert*-butylhydroperoxid in THF bei – 78 °C lieferten die ersten trisubstituierten Epoxide dieser Art. Wasserfreies *tert*-Butylhydroperoxid wurde nach Sharpless *et al.* in Toluol dargestellt.^[373] Die Umsetzung der *Z*-konfigurierten Alkene (**421–426**) in die entsprechenden Epoxide blieb leider weitestgehend erfolglos, was auch schon teilweise in der Publikation von Moore *et al.* angedeutet wurde (Abbildung 88B). Aufgrund der zwei Carbonylgruppen und des Substituenten am C-2-Atom der Alkene, führt die Chelatisierung mittels des Lithiums das Sauerstoffatom einmal von „unten“ und einmal von „oben“ an die Doppelbindung heran, wodurch es im Fall der *trans*-Epoxide zu zwei möglichen Enantiomerenpaaren, (*S,S*) bzw. (*R,R*) kam (s. Abschnitt 2.4.6). Eine unangenehme Nebenreaktion (Abbildung 88C) resultiert

durch die unerwünschte Spaltung des *tert*-Butylhydroperoxids durch Organolithium-Verbindungen (*tert*-BuLi, MeLi, etc.) Wobei das Hauptproblem die induzierten Umesterungsreaktionen der Methylester bedingt durch das entstandene *n*-Butoxid und *tert*-Butoxid darstellt. Bei symmetrischen Estern der Edukte (Alkene) z.B. Dimethylestern, sollte daher MeLi und bei *tert*-Butylestern *tert*-BuLi verwendet werden. Für die gemischten bzw. orthogonal geschützten Verbindungen, z.B. Methyl/*tert*-Butylester (Alkene) muss ein Mittelweg gefunden werden. Hierbei ist zuzusagen, dass der Methylester leichter als der sperrige *tert*-Butylester zur Umesterungsreaktion neigt, und somit die unerwünschte Umesterungsreaktion durch den Einsatz von MeLi auf ein Minimum reduziert werden kann. Unter diesem Gesichtspunkt wurde für die Epoxidierung der orthogonal (Methyl-/*tert*-Butylester) geschützten (*E*)-Alkene Methyllithium eingesetzt. Epoxidierungsstudien mit *tert*-Butyllithium bestätigten diese Annahme, es kam schneller und stärker zu Umesterungsreaktionen. Die Umesterungsreaktion kann nicht vollständig unterdrückt werden, so dass eine kontrollierte Zugabe von MeLi mittels Spritzenpumpe (0.2 ml/1 h) als auch eine kontinuierliche Reaktionskontrolle (DC- und Epoxid-Färbereagenz) essentiell für eine erfolgreiche Umsetzung sind. Das unerwünschte Umesterungsprodukt konnte säulen-chromatographisch mit *n*-Hexan/Ethylacetat oder *n*-Hexan/Diethylether abgetrennt werden.

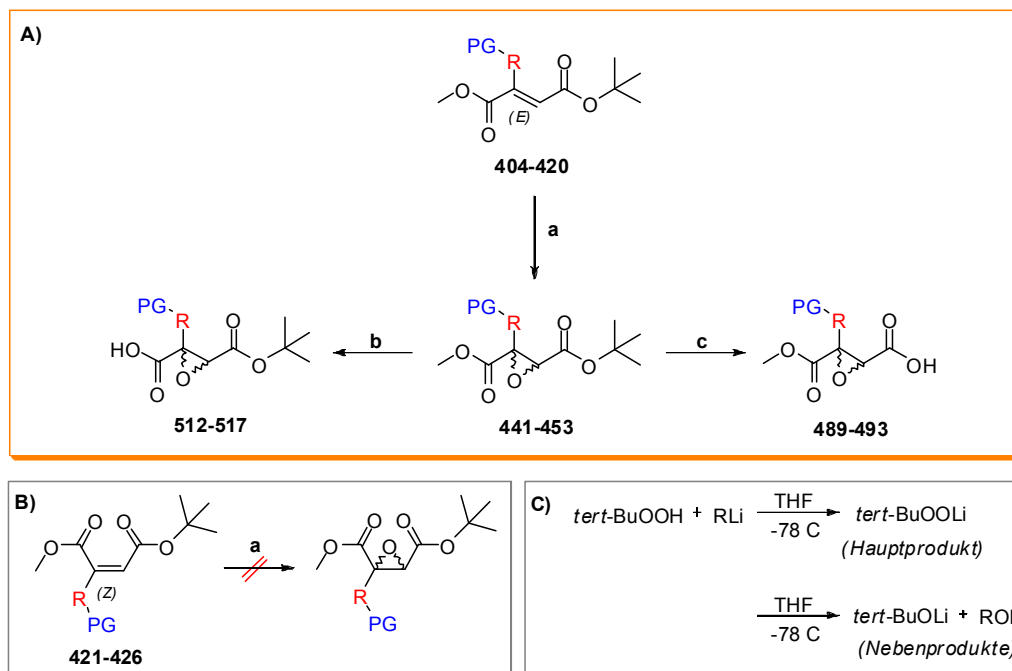


Abbildung 88: Direkten Epoxidierung von elektronenarmen (*E*)- (**A**) bzw. (*Z*)-Alkenen (**B**) nach der von Moore *et al.* publizierten Methode; a) *tert*-Butylhydroperoxid, MeLi, THF, -78 °C → RT, 5 h, >30%; b) LiOH (0.5 M), THF, 0 °C, 2 h, >80%; c) TFA, TIPS, DCM, RT, 2 h, >80%. (**C**) Spaltung von *tert*-Butylhydroperoxid durch Organolithium-Verbindungen.

Die Darstellung der aliphatischen (**441-442**, **445**, **452-453**), aromatischen (**450-451**) und zyklischen Epoxide (**443-444**) liesen sich nach dem publizierten Protokoll relativ gut realisieren, wobei sie in Ausbeuten >50% erhalten wurden. Die seitenkettenfunktionalisierten bzw. geschützten Verbindungen (**446-449**) zeigten oftmals unerwünschte Nebenreaktion oder es kam aufgrund der sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe zu verminderten Ausbeuten. Speziell die Umsetzung der (*E*)-Alken-Asp(OBzl)-OtBu (**415**) und (*E*)-Alken-Aspartat(OMe)-OtBu (**416**) Derivate gestaltete sich schwierig und blieb mit Ausbeuten von 21% weit hinter den Erwartungen zurück. Eine mögliche Ursache für die stark erschwerte Epoxidierung der Aspartat-Derivate (**415**; **416**) liegt in der zusätzlichen Carbonyl-Gruppe der beiden Verbindungen begründet, welche zusätzlich von dem eingesetzten Lithium chelatisiert wird und dadurch unerwünschten Neben- und Zersetzungsreaktionen einleitet. Das benzylgeschützte (*E*)-Alken-Tyr(OBzl)-OtBu **417** ließ sich trotz mehrmaliger Optimierung der Reaktionsbedingungen nicht in das gewünschte *trans*-Epoxid überführen, wohingegen die Epoxidierung des ungeschützten Derivats **418** demnach in einer unzureichenden Ausbeute von 30%, dargestellt werden konnte. Mit der von Moore *et al.* beschriebenen Methode lassen sich bis zu einem gewissen Maß trisubstituierte *trans*-Epoxide in Ausbeuten bis zu 70% darstellen. Die Umsetzungen der Z-konfigurierten Alkene führten zu keiner signifikanten Produktbildung (<5%), was wahrscheinlich mit der räumlich engen Anordnung der Carboxygruppen in Verbindung steht. Die Umsetzung polarer oder sterisch anspruchsvoller Reste in der Seitenkette der (*E*)-Alkene scheint jedoch ebenfalls mit dieser Methode nur begrenzt möglich zu sein. Zwangsläufig auftretenden Umesterungsreaktionen gestalten die Epoxidierung orthogonal geschützter Alkene zusätzlich schwierig. Eine Stereoselektivität kann aufgrund der beiden Carboxyfunktionen und der Substituten an C-2 nur teilweise induziert werden, wobei immer das (*S,S*)- und (*R,R*)-Isomer gebildet wird. Im Falle nur einer Carboxygruppe wurde von Moore *et al.* mittels der beschriebenen Methode Stereo-, Regio-, bis hin zu Chiroselektivität beobachtet. Somit war es zwar möglich die gewünschten Epoxide darzustellen, jedoch nicht in enantiomerenreiner Form, was für die weitere Synthese der Inhibitorbausteine von großem Vorteil wäre. Für die Trennung der Enantiomerenpaare (*S,S*;*R,R*) wurden zwei unterschiedliche Ansätze unternommen. Im ersten Ansatz sollten die Epoxysuccinate **441** und **450** mit TFA/DCM selektiv *tert*-Butylester geschützt werden und folgend mittels eines chiralen Alkohols über eine EDC/DMAP katalysierte Umsetzung in die entsprechenden diastereomeren Ester (**519** und **520**) überführt, und säulenchromatographisch getrennt werden (s. Abbildung 89A). Anschließend sollte durch ¹H-NMR-Experimente (NOE) über die Kopplung des Wasserstoffatoms an C-3 und C-1 die absolute Konfiguration der enantiomerenreinen Verbindungen basierend auf der nach Dale und Mosher etablierten Methode bestimmt werden.^[374] Diese Prozedur wurde unter Umkehrung der Reaktanten (Säure/Alkohol) und geringfügigen Modifikation des

Protokolls in Anlehnung an die Publikation von Rojas-Cabrera *et al.* durchgeführt.^[375] Die Kupplungsrohausbeuten für die diastereomeren Ester (*S,S,S*; **520**) (*R,R,S*; **519**) von gesamt 35% blieben leider weit hinter den publizierten Ausbeuten von ca. 45% je Diastereomer zurück. Mehrfache Optimierungsversuche der Reaktionsbedingungen und Reaktantenmengen blieben erfolglos. Die folgende Trennung der Diastereomere **519** und **520** mit einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 5:1) verlief weitestgehend problemlos, wobei eine relativ große Mischfraktion der beiden Diastereomere nicht vermieden werden konnte und dadurch die Ausbeuten der Diastereomere weiter auf ca. 10% je Diastereomer abfiel.

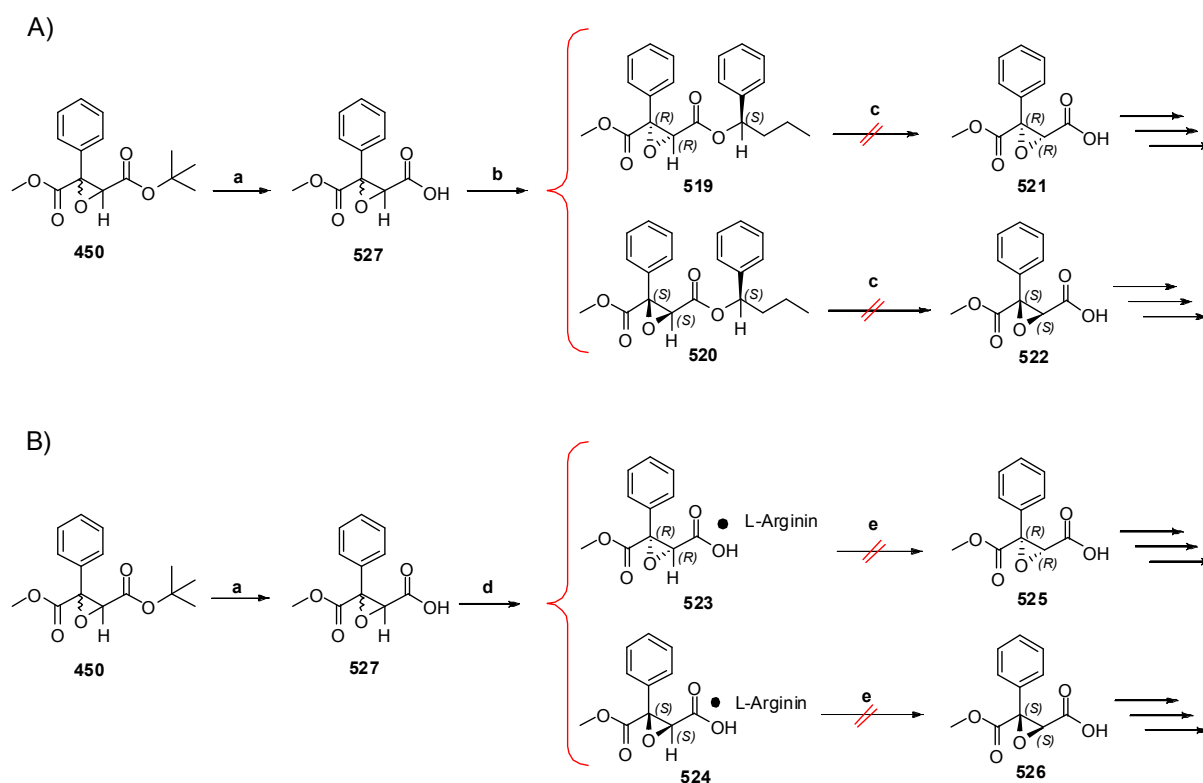


Abbildung 89: Schematische Darstellung zur Trennung der Enantiomerenpaare: **A)** (a) TFA, TIPS, DCM, RT, 2 h, >80%; (b) (*S*)-(-)-1-Phenyl-1-butanol, EDC, DMAP, DCM, RT, 12 h, 20%. (c) LiOH (0.5 M), THF, 4 h, 10%. **B)** (a) TFA, TIPS, DCM, RT, 2 h, >80%; (d) L-Arginin, MeOH, H₂O, RT, 24 h, 12%; (e) H₂SO₄, H₂O, 0 °C, 30 min, 52%.

Eine erneut notwendige Entschützung der chiralen Ester mit LiOH bedingte auch größtenteils die Entschützung des Methylesters und hob somit die Orthogonalität der Schutzgruppen auf. Eine teilweise Verseifung des Methylesters wurde erwartet, wobei in diesem Ansatz vorerst einmal geklärt werden sollte, ob diese Methode überhaupt eine Option zur Trennung der enantiomeren Epoxide darstellt. Die vermeintlichen enantiomerenreinen Methylester (**522**) und (**521**) konnte nur in Ausbeute von ca. 5% erhalten werden. Eine anschließende

Überführung der freien Säure (nicht gezeigt) in den entsprechenden *tert*-Butylester, sowie eine erneute Entschützung einer der beiden Ester für die anschließende Peptidsynthese gestalteten sich für die Umsetzung einer Epoxidbibliothek zu aufwendig, so dass aufgrund der inakzeptablen Ausbeuten und der aufwendigen Reaktionsführung für die Diastereomerentrennung mit der von Rojas-Cabrera *et al.* modifizierten Methode abgesehen wurde. Desweiteren wäre eine Umkehrung der Schutzgruppenstrategie der orthogonal geschützten Carbonsäureester für eine sinnvolle Entschützung der gebildeten Diastereomer notwendig gewesen, was den synthetischen Aufwand weiter vergrößert hätte.

Eine weitere Möglichkeit zur Trennung enantiomerer *trans*-Epoxysuccinate wurde von Ohashi und Harada *et al.* mittels der Darstellung diastereomerer Salze durch den Einsatz von (-)-Ephedrin publiziert.^[376] Eine darauf aufbauende kostengünstigere Trennung diastereomerer Salze wurde von Tamai *et al.* mit unterschiedlichen Aminen wie z.B. L-Arginin, L-Phenylalaninol oder L-Phenylalaninamid veröffentlicht.^[377] Daher sollte in Anlehnung an die von Tamai *et al.* beschriebene Methode eine Trennung der enantiomeren *trans*-Epoxide (**441**, **450**) mit L-Arginin und L-Phenylalaninamid erfolgen (s. Abbildung 89B). Im Fall beider Kristallisationsversuche mittels L-Arginin oder L-Phenylalaninamid wurden die Amine zuerst in warmem Wasser gelöst, und folgend langsam dem in Methanol gelösten *trans*-Epoxysuccinat (**527**) zugesetzt und für 24 h bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Eine anschließende Filtration der diastereomeren Salze (*S,S,S*; **523**) (*R,R,S*; **524**) und folgender Umkristallisation sollten die sauberen enantiomerenreinen *trans*-Epoxysuccinate **525** (*S,S*) und **526** (*R,R*) liefern. Die Ausbeuten der gebildeten diastereomeren Salze mit L-Arginin oder L-Phenylalaninamid blieben weit hinter den veröffentlichten Ergebnissen von Tamai *et al.* mit ca. 85% pro Diastereomer zurück. Mehrfache Versuche der Reaktionsoptimierung sowie der Einsatz unterschiedlicher Amine wie z.B. L-Phenylalaninol, (-)-Ephedrin und D-Phenylglycinamid führten zu keiner Verbesserung der Ausbeuten. Synthesestudien mit vollständig entschützten *trans*-Epoxydisäuren bestätigten jedoch, dass wie auch schon in der Vorschrift von Tamai *et al.* zwei freie Säurefunktionen für eine reproduzierbare Überführung der *trans*-Epoxysuccinate in die entsprechenden diastereomeren Salze notwendig sind. Eine Entschützung beider Carbonsäureester für die Trennung der enantiomeren Epoxide würde jedoch die orthogonale Schutzgruppenstrategie aufheben und die Umsetzung der geplanten Synthesestrategie unmöglich machen. Nachdem unzählige Ansätze zur Trennung der enantiomeren *trans*-Epoxysuccinate nicht zufriedenstellend umgesetzt werden konnten, wurde eine mögliche Trennung der enantiomeren Epoxide auf der Stufe der Tripeptide in Betracht gezogen. Aufgrund der etablierten Synthesestrategie für die *E*-selektive Darstellung der (*E*)-Alkene sollte ein weiterer Ansatz für die Synthese enantiomerenreiner *trans*-Epoxysuccinate ausgehend von den dargestellten (*E*)-Alkenen unternommen werden. Der besondere strukturelle Aufbau, sowie die sterischen Eigenschaften der dargestellten (*E*)-

Alkene grenzen deren mögliche Umsetzung in die entsprechenden Epoxide jedoch stark ein. Ein möglicher Zugang zu enantiomerenreinen Epoxiden ausgehend von (*E*)-Alkenen (Abbildung 90) wurde von Kolb und Sharpless veröffentlicht.^[238] Auf diesem Weg wurden die (*E*)-Alkene zuerst enantioselektiv über die von Sharpless *et al.* veröffentlichte „Asymmetrische Dihydroxylierung“ in die entsprechenden Diole und anschließend durch eine intramolekulare S_N2-Reaktion in die jeweiligen enantiomerenreinen Epoxide (s. Abschnitt 2.4.7) überführt.

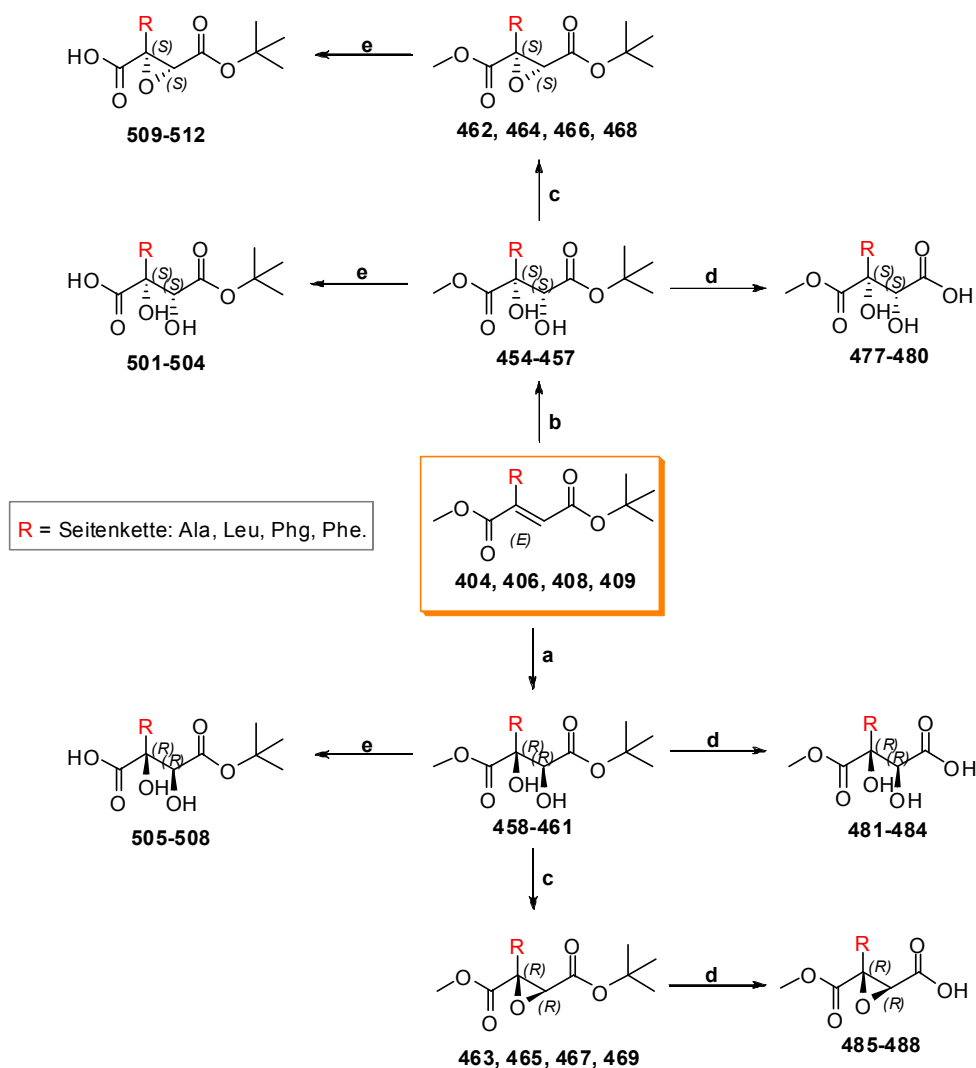


Abbildung 90: Darstellung der enantiomerenreinen Diole und Epoxide: a) AD-Mix- α ($K_2OsO_2(OH)_4$, $(DHQ)_2$ -PHAL, $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3), Methansulfonamid, *tert*-Butanol/ H_2O (1:1), RT, 13 h, >80%; b) AD-Mix- β ($K_2OsO_2(OH)_4$, $(DHQD)_2$ -PHAL, $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3), Methansulfonamid, *tert*-Butanol/ H_2O (1:1), RT, 13 h, >80%; c) Trimethylorthoacetat, *p*-Toluolsulfonsäure, DCM, 15 min, RT, TMSCl, K_2CO_3 , MeOH, -17 °C, 2 h, >80%; d) TFA, DCM, TIPS, RT, 2 h, >80%; e) LiOH (0.5 M), THF, 0 °C, 2 h, >70%.

In Abhängigkeit von dem verwendeten Dihydroxylierungs-Mix, AD-Mix- α oder AD-Mix- β konnten ausgehend von den eingesetzten *trans*-Alkenen (**404**, **406**, **408**, **409**) entweder das (S,S)- **454-457** oder (R,R)-Diol **458-461** erhalten werden (s. Abschnitt 2.4.5). Während erster Synthesestudien mit ausgewählten (*E*)-Alkenen (**404**, **406**, **408**, **412**, **414**, **415**, **416**, **417**) wurde schnell klar, dass zwar die aliphatischen und aromatischen Alkene mit dem AD-Mix- β in hoher Enantioselektivität (>90%) in die entsprechenden (S,S)-Diole überführt werden konnten, jedoch eine Umsetzung der Alkene mit polaren (**413**, **414**), geladenen (**415**, **416**) oder sterisch anspruchsvollen Funktionalitäten (**415**, **417**) nicht toleriert wurden, und es zu keiner Produktbildung kam. Auch die Dihydroxylierung des stark elektronenarmen (*E*)-Alken- β -Fluor-Ala-OtBu (**412**) mit AD-Mix- α oder AD-Mix- β lieferte kein nachweisbares bzw. isolierbares Produkt. Mehrfache Optimierungsversuche hinsichtlich der Temperatur, Reaktionszeit und Reaktantenäquivalenten führten zu keiner Verbesserung. Eine Reduktion des sterischen Anspruchs der Schutzgruppe von (*E*)-Alken-Aspartat(OBzl) **415** hin zu (*E*)-Alken-Aspartat(OMe) **416** führten zu keiner nennenswerten Produktbildung (<5%). Zusätzlich wurde die mögliche Umsetzung einer Auswahl von Z-konfigurierten Alkenen (**421-424**) mittels der AD in die entsprechenden *cis*-Dirole untersucht, wobei es zu keinem nachweisbaren Produkt kam. Unter diesen Aspekten musste von einer Umsetzung der polaren (**413**, **414**, **417**, **418**), ionischen (**415**, **416**), und sterisch anspruchsvollen (*E*)-Alkenen (**419**) mit der Asymmetrischen Dihydroxylierung abgesehen werden.

Tabelle 6: Ausbeuten und ee-Werte der synthetisierten Dirole.

Diol mit Seitenkette	Verb. Nr.	Ausbeute in [%]	ee-Wert [%] (S,S)	Verb. Nr.	Ausbeute in [%]	ee-Wert [%] (R,R)
Ala ^[a]	454	92%	99%	458	79%	85%
Leu ^[a]	455	79%	90 %	459	65%	53%
Phg ^[a]	456	83%	99%	460	64%	90%
Phe ^[a]	457	72%	80%	461	62%	60%

[a] Chiral-Analytik bzw. Bestimmung der ee-Werte der Dirole: Als isokratisches Lösungsmittelsystem diente *iso*-PrOH und *n*-Hexan (50:50) bei einer Flussrate von 0.8 ml/min. Der ee-Wert wurde über die Verhältnisse der Peakintegrale errechnet und in Prozent (%) angegeben.^[378]

Die Darstellung der (R,R)-Dirole mit dem AD-Mix- α verlief für die aliphatischen (**404**, **406**) und aromatischen (*E*)-Alkene (**408**, **409**) problemlos, wobei die ee-Werte (>60%) der entsprechenden (R,R)-Dirole eine geringere Selektivität aufwiesen als die dargestellten (S,S)-Dirole. Die Umsetzung mit dem AD-Mix- β (DHQD)₂PHAL in das entsprechende (S,S)-Diol ergab für (S,S)-Diol-Ala (**454**) einen ee-Werte von 99%, wohingegen die Umsetzung mit AD-Mix- α (DHQ)₂PHAL für (R,R)-Diol-Ala (**458**) nur einen ee-Wert von 85% lieferte (s. Abbildung 91). Diese Tendenz setzte sich auch für die anderen Verbindungen fort.

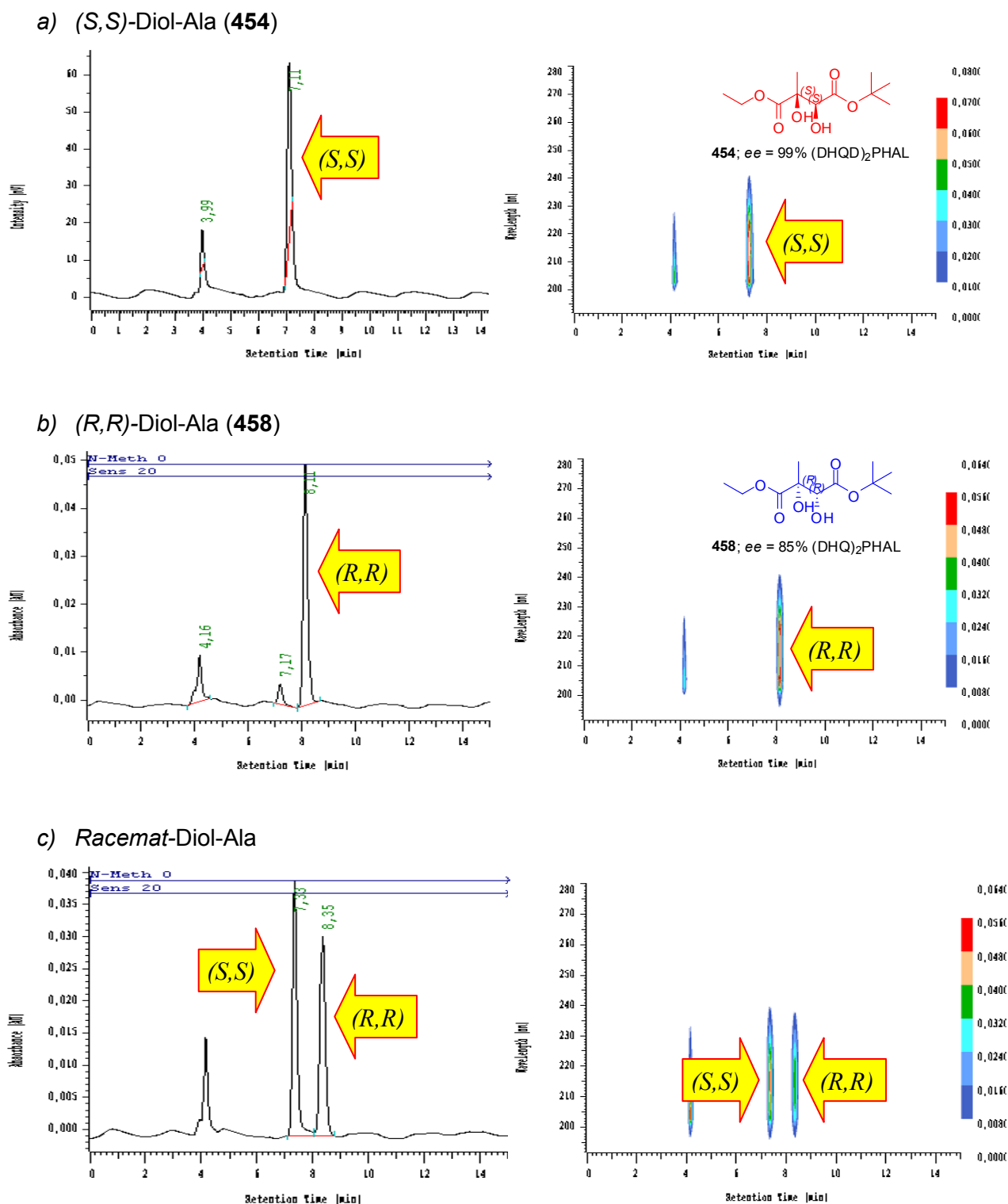


Abbildung 91: HPLC-Chromatogramm des a) nach der asymmetrischen Dihydroxylierung gewonnenen (S,S)-Diol-Ala **454**; b) (R,R)-Diol-Ala **458** und c) des entsprechenden Racemats. Über die Peakintegrale errechnete sich ein ee-Wert für **454** (S,S) von 99% und **458** (R,R) von 85% (Säule: Diacel-Chiralpak AD-H, Eluent: *iso*-PrOH/*n*-Hexan; 50:50; 0.8 ml/min); Vergleich der enantiomeren Überschüsse der nach Dihydroxylierung mit Ligandensystem (DHQD)₂PHAL oder (DHQ)₂PHAL erhaltenen (S,S)-, bzw. (R,R)-Diole.

Interessanterweise führte der Einsatz von AD-Mix- α (DHQD)₂PHAL bei der Darstellung von (*R,R*)-Diol-Phe (**461**) und (*R,R*)-Diol-Leu (**459**) zu einem starken Einbruch der Enantioselectivität (*ee* = 60%; 53%, entsprechend), im Vergleich zu dem (*R,R*)-Diol-Ala (**458**, *ee* = 85%) bzw. (*R,R*)-Diol-Phg (**460**; *ee* = 90%). Eine mögliche Ursache hierfür könnte der Längenunterschied aufgrund der zusätzlichen CH₂-Gruppe von **459** und **461** sein, da hinsichtlich der kleinen Methylgruppe von **458** und der Phenylgruppe von **460** die enantiomeren Verhältnisse nahezu konstant bleiben. Der Einsatz des Ligandensystems (DHQ)₂PHAL scheint längere Substituenten am C-2 der (*E*)-Alkene schlechter zu tolerieren als (DHQD)₂PHAL wie anhand der Ausbeuten und *ee*-Werte für die mit der „Asymmetrischen Dihydroxylierung“ dargestellten (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Diole in Tabelle 6 ersichtlich ist.

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Umsetzung mit dem AD-Mix- β (DHQD)₂PHAL zu den entsprechenden (*S,S*)-Diole (**454-457**) in höherer Enantioselectivität und besserer Ausbeute erfolgt als mit AD-Mix- α (DHQ)₂PHAL). In Abbildung 91 sind exemplarisch die HPLC-Läufe von (*S,S*)- (**454**) bzw. (*R,R*)-Diol-Ala (**458**) für die Bestimmung der *ee*-Werte mittels Diacel Chiral-AD-H (*iso*-PrOH/*n*-Hexan; 50:50; 0.8 ml/min), und in Abbildung 92 und 93 die entsprechenden ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von (*S,S*)-Diol-Ala (**454**) wiedergegeben.

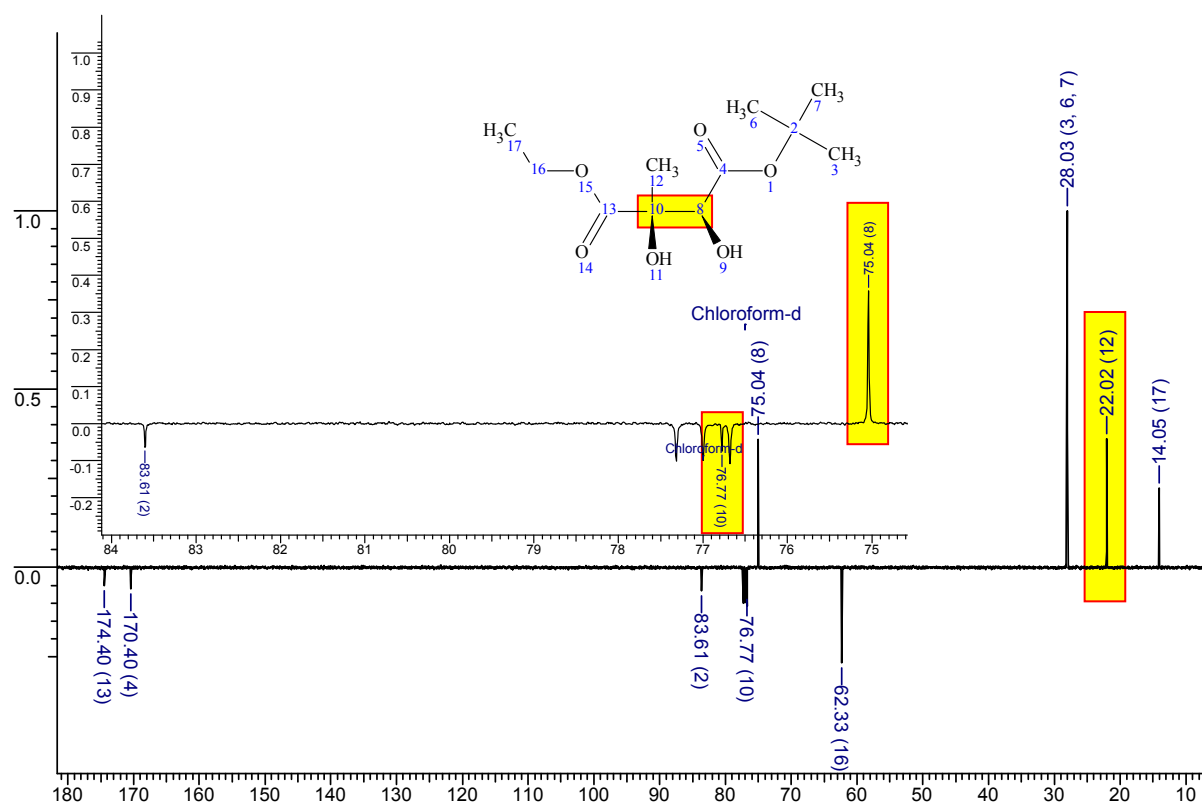


Abbildung 92: ¹³C-NMR-Spektrum von enantiomerenreinem (*S,S*)-Diol-Ala (**454**) in CDCl₃ (77.0 ppm). Signifikant sind die Signale der Kohlenstoffatome C-8 und C-10 (Stereozentren) bei 75.0 ppm bzw. 76.8 ppm, als auch das Kohlenstoffatom der Methylgruppe C-12 bei 22.0 ppm.

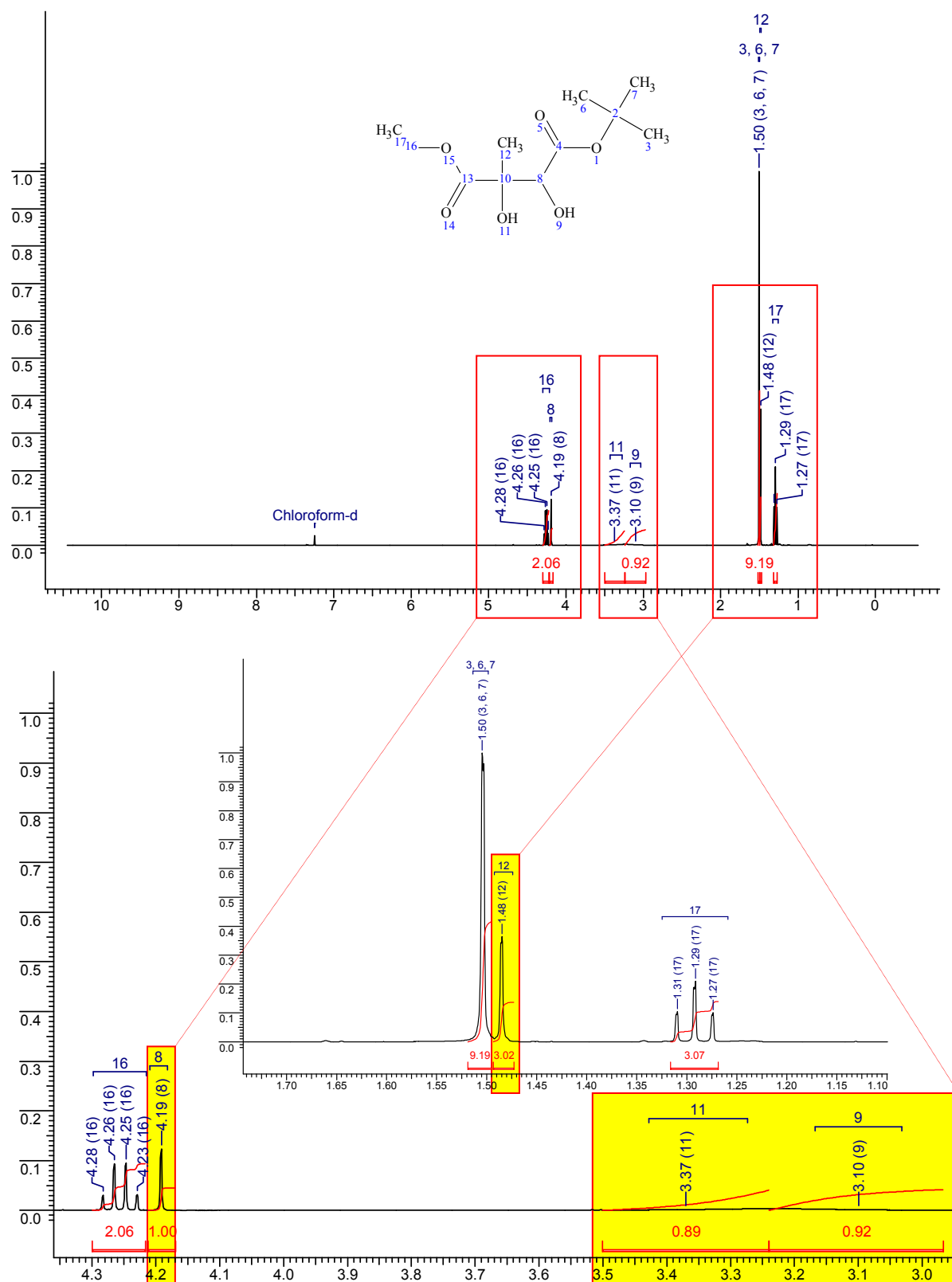


Abbildung 93: Ausschnitte aus dem ^1H -NMR-Spektrum von enantiomerenreinem (S,S)-Diol-Ala (**454**) in CDCl₃ (7.25 ppm). Charakteristisch sind die Signale der Protonen an dem C-8 Stereozentrum bei 4.19 ppm, sowie die beiden breiten Signale der Hydroxygruppen an C-10 (3.37 ppm) bzw. C-8 (3.10), sowie die Methylgruppe bei 1.48 ppm in Nachbarschaft zu der Hydroxyfunktion an C-10.

Eine stereospezifische Überführung der Diole in die jeweiligen Epoxid war aufgrund der begrenzten Substrattoleranz der Asymmetrischen Dihydroxylierung ausschließlich mit den aliphatischen und aromatischen (*S,S*)- (**454-457**) bzw. (*R,R*)-Diole (**458-461**) möglich (Abbildung 90). Die Darstellung der Epoxide mittels der nach Sharpless publizierten Vorschrift erfolgte in einer Eintopfreaktion mit Trimethylorthoacetat und *p*-Toluolsulfonsäure in DCM bei Raumtemperatur innerhalb 15 min in die entsprechenden Orthoester. Die gebildeten Orthoester wurden dann durch den Zusatz von TMSCl und Erwärmen auf 70 °C unter Inversion der Konfiguration in die entsprechenden Acetoxoniumionen überführt (s. Abschnitt 4.5.7). Die flüchtigen Komponenten wurden unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen auf -17 °C gekühlt und K₂CO₃ der Reaktionslösung zugesetzt, wobei es zu einer intramolekularen S_N2-Reaktion unter Inversion der Konfiguration kam, und dadurch die entsprechenden (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Epoxide unter Retention der Konfiguration erhalten wurden. Für die Darstellung der aromatischen Epoxide wurde die Synthesevorschrift geringfügig modifiziert, wobei hauptsächlich Acetylbromid anstatt TMSCl verwendete wurde.^[i]

Tabelle 7: Ausbeuten und ee-Werte der synthetisierten Epoxide.

Epoxid mit Seitenkette	Verb. Nr.	Ausbeute in [%]	ee-Wert [%] (<i>S,S</i>)	Verb. Nr.	Ausbeute in [%]	ee-Wert [%] (<i>R,R</i>)
Ala ^[a]	466	81%	99%	467	78%	83%
Leu ^[a]	468	79%	88%	469	63%	55%
Phg ^[a]	462	85%	99%	463	80%	92%
Phe ^[a]	464	77%	99%	465	70%	70%

[a] Chiral-Analytik bzw. Bestimmung der ee-Werte der Diole: Als isokratisches Lösungsmittelsystem diente *iso*-PrOH und *n*-Hexan (50:50) bei einer Flussrate von 0.8 ml/min. Der ee-Wert wurde über die Verhältnisse der Peakintegrale errechnet, und in Prozent (%) angegeben.^[378]

Die Ausbeuten und ee-Werte der synthetisierten Epoxide sind in Tabelle 7 wiedergegeben. In Abbildung 94 sind exemplarisch die HPLC-Läufe von (*S,S*)- **462** bzw. (*R,R*)-Epoxid-Phg **463** für die Berechnung der enantiomeren Verhältnisse, sowie in Abbildung 95 und 96 die entsprechenden ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von (*S,S*)-Epoxid-Phg **462** dargestellt. Die stereoselektive Synthese von Epoxiden, mit der von Sharpless *et al.* beschriebenen Methode ließ sich ohne weitgreifende Modifikationen der Reaktionsbedingungen auf die eingesetzten aliphatisch (**454, 455, 458, 459**) und aromatischen Diole (**456, 457, 460, 461**) übertragen.

^[i] für Details siehe experimenteller Teil dieser Arbeit.

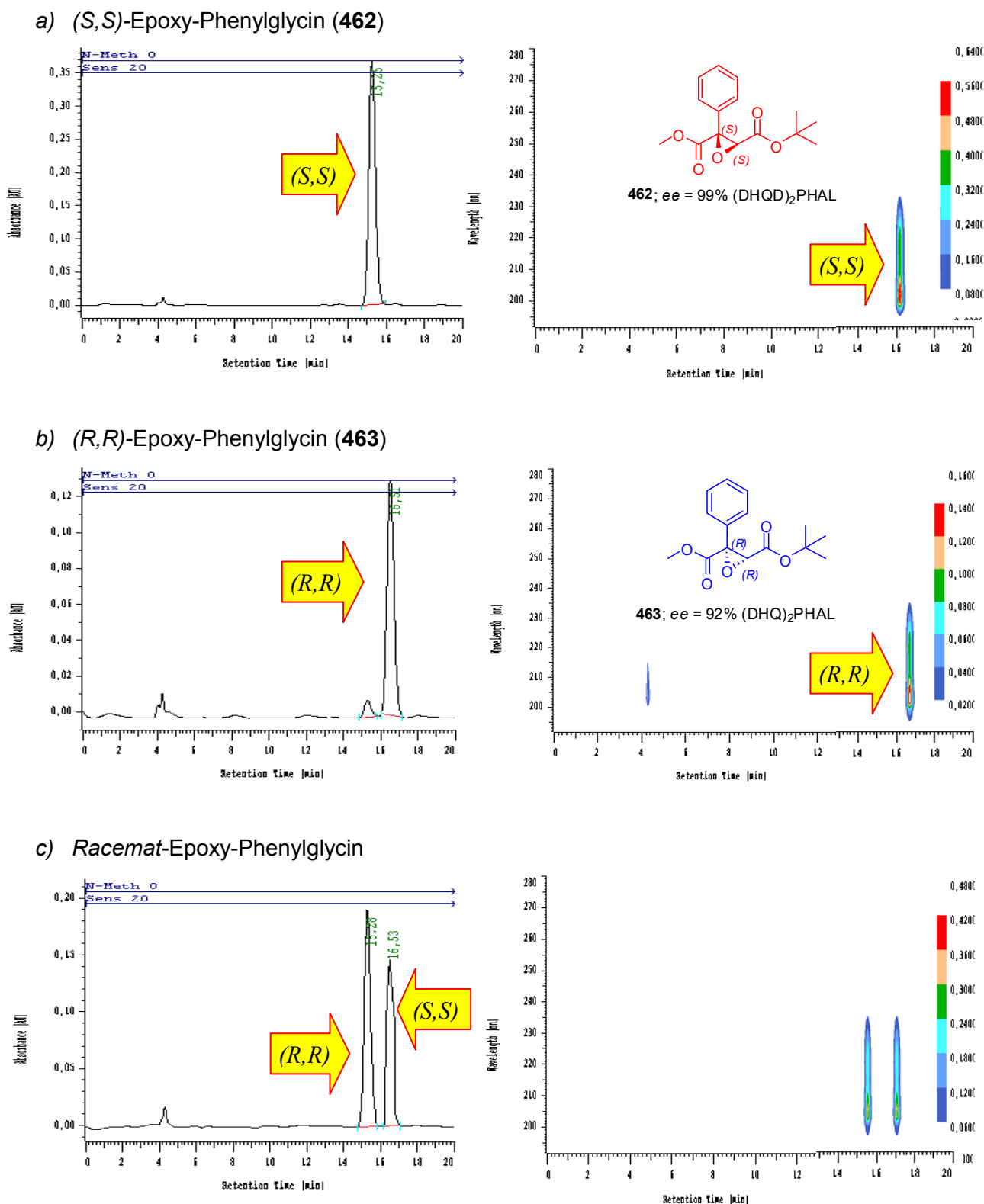


Abbildung 94: HPLC-Chromatogramm des a) nach der asymmetrischen Dihydroxylierung gewonnenen *(S,S)*-Epoxy-Phg **462**; b) *(R,R)*-Epoxy-Phg **463** und c) des entsprechenden Racemats. Über die Peakintegrale errechnete sich ein ee-Wert von 99 % für **462** (*S,S*) und 92 % für **463** (*R,R*) (Säule: Chiralpak AD-H, Eluent: *iso*-PrOH/*n*-Hexan; 50:50; 0.8 ml/min).

Die vorgegeben enantiomeren Verhältnisse der eingesetzten (*S,S*)- und (*R,R*)-Diole konnten während deren Überführung in die entsprechenden (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Epoxide reproduzierbar wiedergegeben werden. Daher änderten sich die erhaltenen *ee*-Werte für die überführten (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Epoxide nur marginal im direkten Vergleich zu den gemessenen *ee*-Werten der korrespondierenden (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Diole. Die darauffolgenden Entschützungen der Diole als auch der Epoxide für die Darstellung der Tripeptide wurden unter den schon mehrfach erwähnten Standardbedingungen für die Verseifung von Methylestern (LiOH, THF, 0 °C, 2 h) oder *tert*-Butylestern (TFA, DCM, TIPS, RT, 2 h) durchgeführt, und werden hier nicht weiter diskutiert (s. Experimenteller Teil). Nochmals nachdrücklich erwähnt werden soll, dass für die folgenden Kupplungen mit den Dipeptideinheiten, darauf zu achten ist, dass für eine Umsetzung mit den *CA028-like*-Dipeptiden immer der *tert*-Butylester des jeweiligen Warheads zu entschützen ist bzw. der Methylester für die Kupplung mit den *E64c-like*-Dipeptiden.

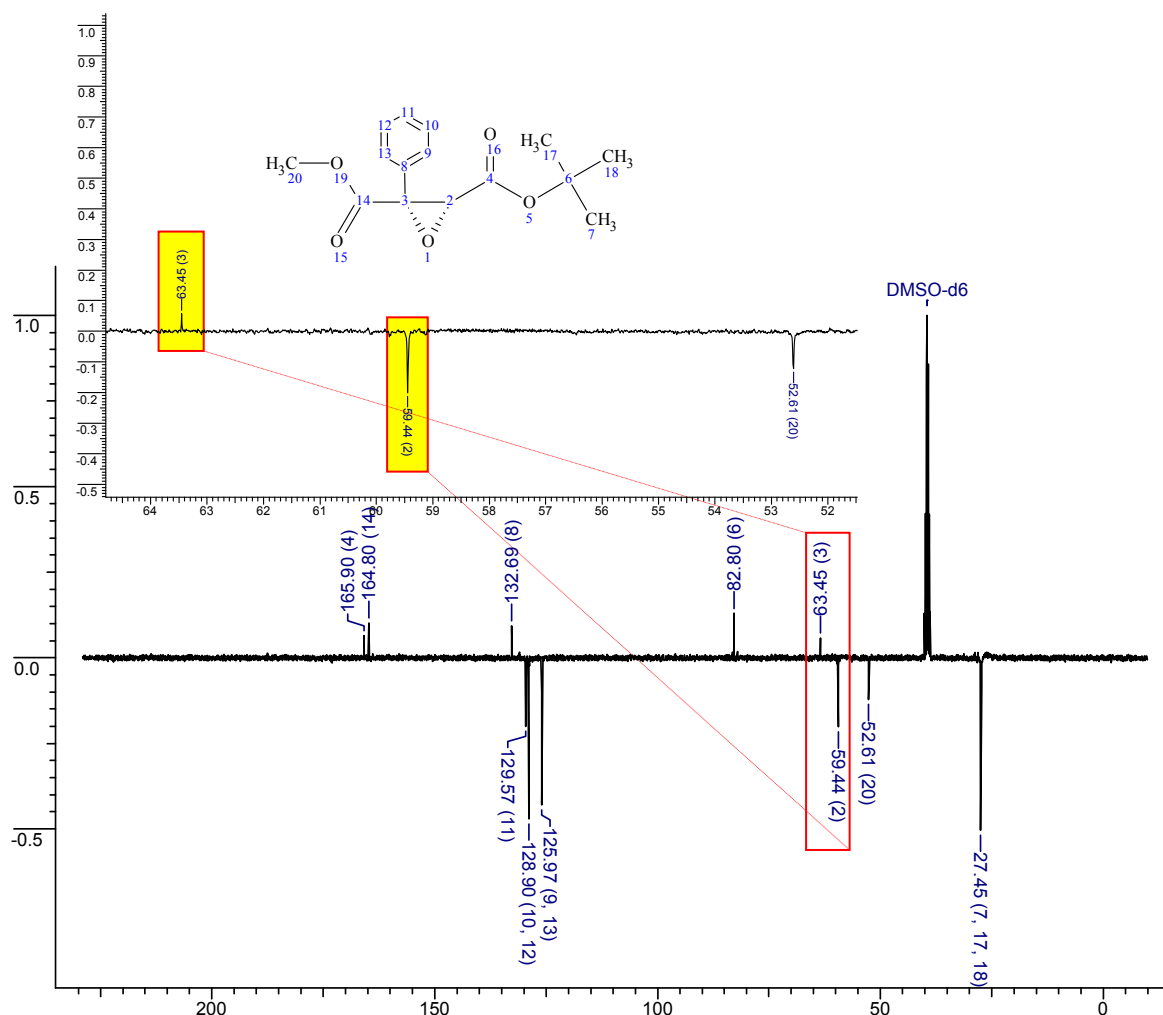


Abbildung 95: Ausschnitte aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von enantiomerenreinem (*S,S*)-Epoxy-Phg (**462**) in DMSO-d_6 . Typisch für (*S,S*)-Epoxy-Phg (**462**) sind die Signale der Kohlenstoffatome an den Stereozentren C-2 und C-3 bei 59.4ppm bzw. 63.5 ppm.

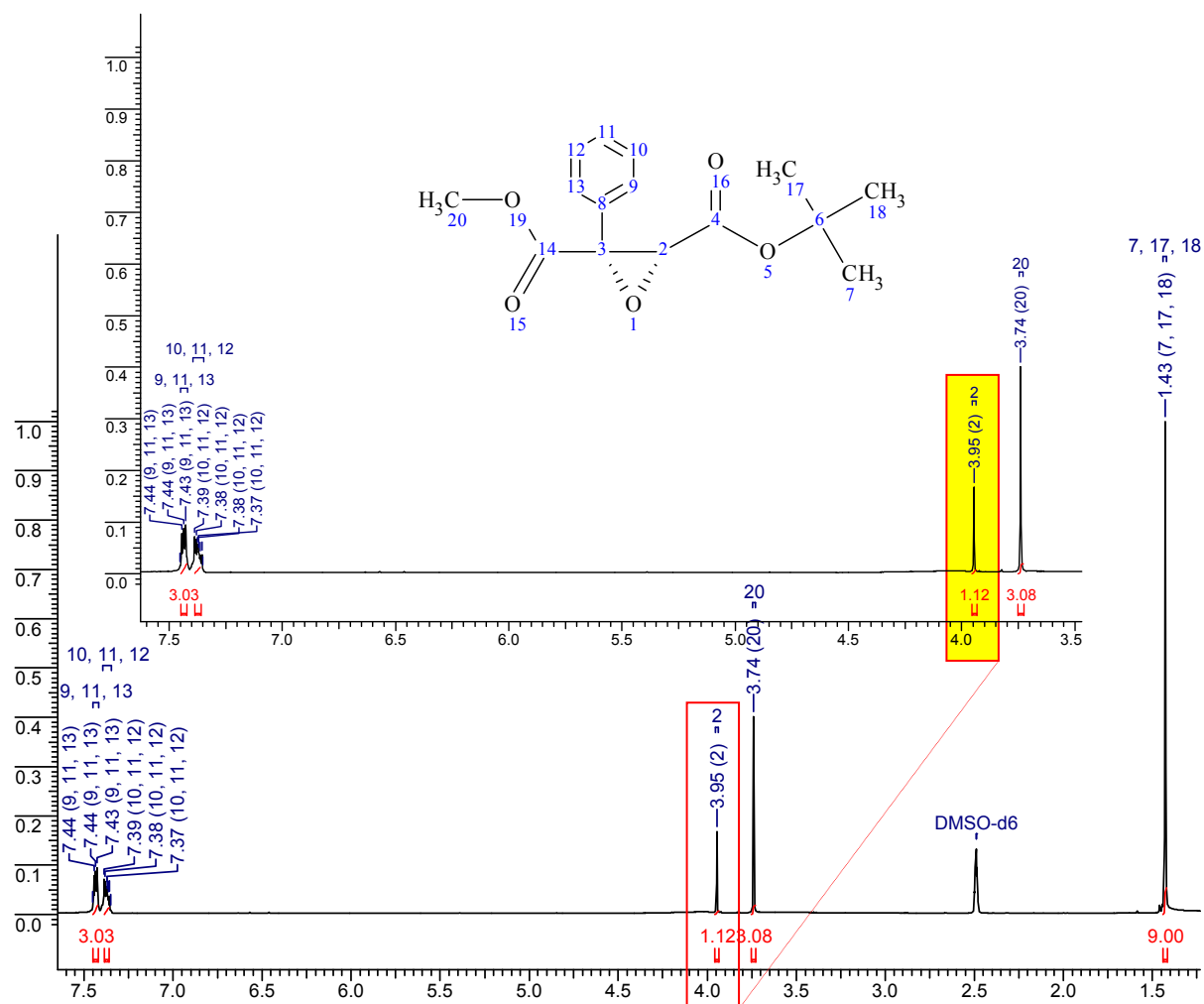


Abbildung 96: Ausschnitte aus dem ^1H -NMR-Spektrum von enantiomerenreinem (S,S)-Epoxy-Ala (**462**) in DMSO-d_6 (2.49 ppm). Charakteristisch ist das Signal des Protons an dem C-2 Stereozentrum bei 3.95 ppm.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die ersten trisubstituierten *trans*-Epoxide dieser Art mittels der direkten Epoxidierung nach Moore *et al.* zugänglich waren, jedoch aufgrund der besonderen Strukturellen Eigenschaften der eingesetzten (*E*)-Alkene nicht in enantiomerenreiner Form zugänglich waren. Eine stereoselektive Darstellung der Epoxide mittels asymmetrischer Dihydroxylierung mit anschließender Überführung der Diole in die entsprechenden *trans*-Epoxide ließ sich aufgrund der begrenzten Substrattoleranz nur für die aliphatischen und aromatischen Systeme realisieren. Für die weitere Umsetzung der „Warheads“ zur Darstellung der Inhibitorbibliothek wurde eine Vorauswahl unterschiedlicher Substitutionsmuster getroffen, so dass zumindest je ein aliphatischer, aromatischer, halogener, zyklischer, polarer, ionischer oder sterisch anspruchsvoller Substituent vertreten ist (Abbildung 97). Die über die asymmetrische Dihydroxylierung gewonnen Diole wurden aufgrund ihrer besonderen strukturellen Eigenschaften für die Darstellung potentieller reversibler Cysteinprotease-Inhibitoren in den Aufbau der Inhibitorbibliothek miteinbezogen.

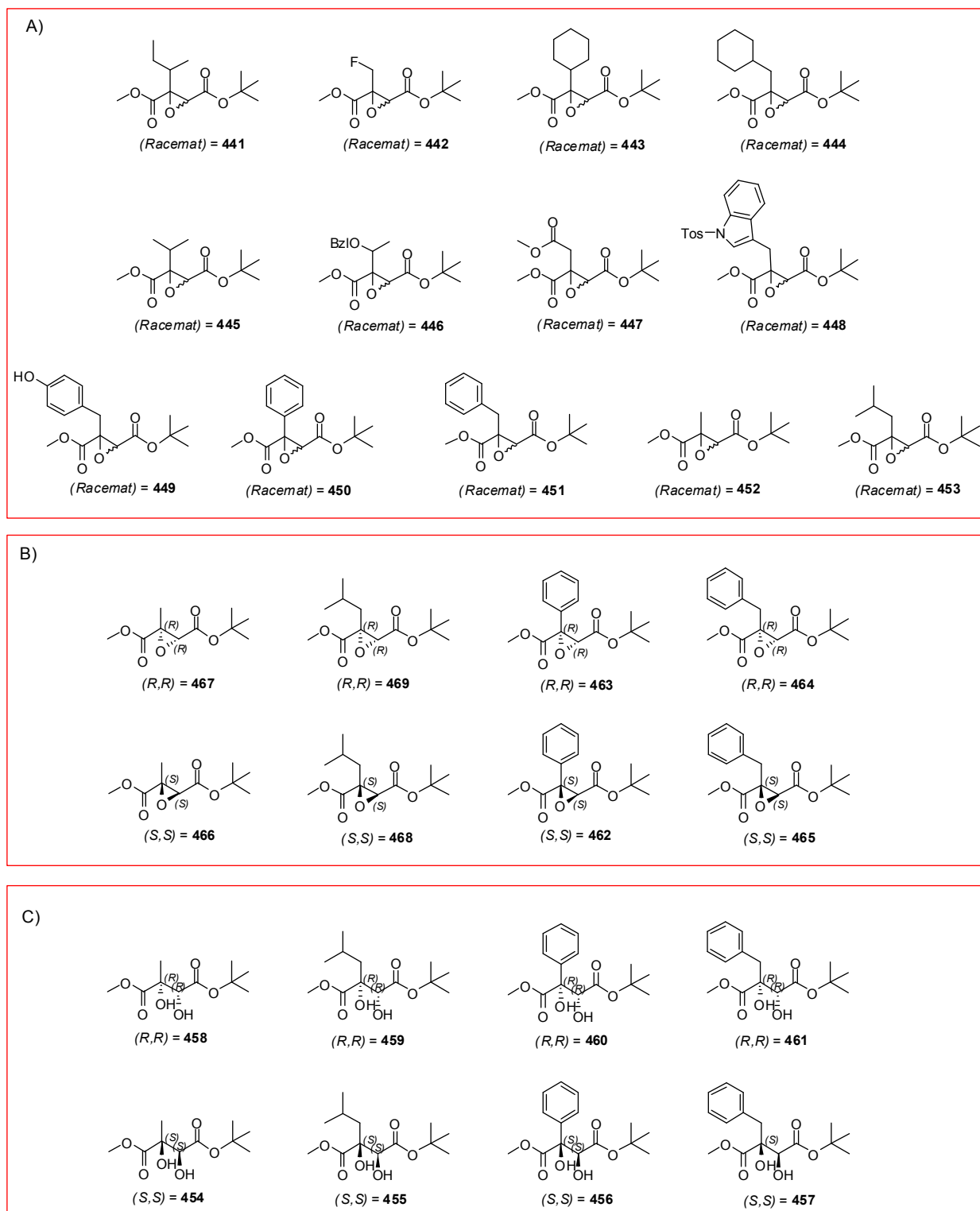


Abbildung 97: Übersicht der nach A) direkter Epoxidierung **441-453** (*rac*-Epoxide), B) asymmetrischer Dihydroxylierung **454-461** (enantiomerenreine Diole) und, C) anschließender S_N2 -Reaktion dargestellten Verbindungen **462-469** (enantiomerenreine Epoxide). Das aufgeführte Spektrum der synthetisierten „Warheads“ (Diol, Epoxid) wurde für die Darstellung der Tripeptid-Inhibitorbibliothek (*E64c*- bzw. *CA028-like*) eingesetzt.

4.2.5 Kupplung der E64c- und CA028-like-Dipeptide mit „Warhead“-Fragmenten zur Darstellung der Tripeptid-Bibliothek

In Anlehnung an die peptidsynthetischen Arbeiten von Sarabie *et al.*^[350] sollte für die oben beschriebenen „Warheads“ (Alken, Diol, Epoxid) ein geeignetes Kupplungsprotokoll entwickelt werden, welches die Knüpfung der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Dipeptid-Motive **321** und **326** mit den jeweiligen Warheads in Lösung vorsah. Hauptaufgabe in diesem Abschnitt war eine razemisierungsfreie Kupplung der Bausteine in Lösung, sowie eine finale Abspaltung aller permanenten Schutzgruppen in möglichst einem Schritt, für den schnellen Zugang zu einer Vielzahl von Tripeptidinhibitoren und für die folgenden enzymkinetischen Charakterisierungen. Die für die Darstellung der E64c-like- und CA028-like-Tripeptide konzipierten Synthesen sind in Abbildung 98 und 109 nochmals schematisch wiedergegeben.

4.2.5.1 Synthese der E64c-like-Tripeptide

Für den Aufbau der E64c-like-Tripeptidbibliothek wurden die Methylester entschützten „Wahrheads“ (Alken, Diol, Epoxid) mit dem Dipeptid **321** in Lösung gekuppelt. Die eingesetzten Kupplungsreagenzien für die Umsetzung der (E)-Alkene (**494-500**), (S,S)- bzw. (R,R)-Diole (**501-508**) und Epoxide (**509-518**) waren immer die gleichen, wobei sich die einzelnen Kupplungen der entsprechenden Warheads in den eingesetzten Reaktionsäquivalenten unterscheiden.

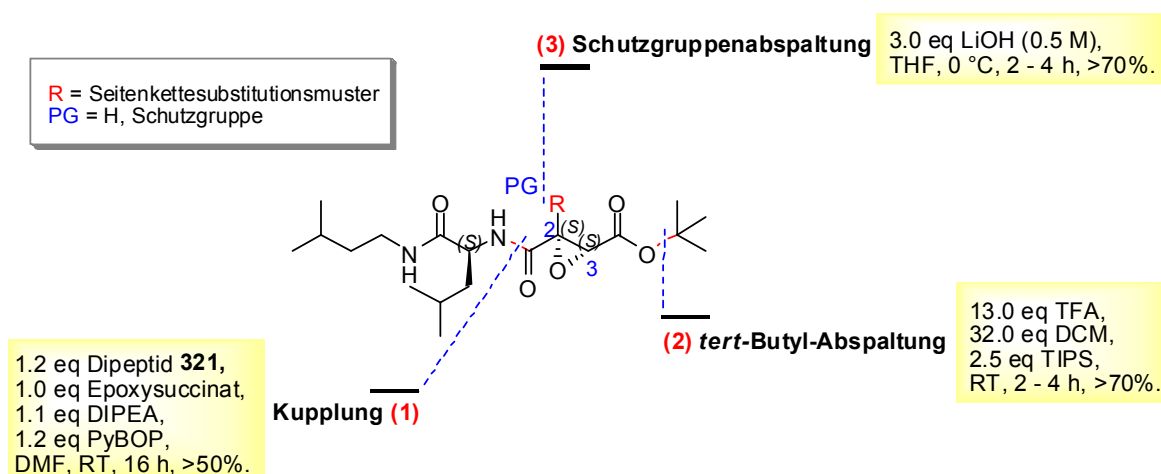


Abbildung 98: Schematische Darstellung der Syntheschnitte durch ein E64c-like Tripeptid. (1) Kupplung des Dipeptids **321** mit einem Warhead (Alken, Diol oder Epoxid) und (2) und anschließender finaler Abspaltung aller permanenter Schutzgruppen (2) und (3).

Die Kupplung der (*E*)-Alkene (**494-500**), (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Diole (**501-508**) und Epoxide (**509-518**) mit *E64c-like*-Dipeptid **321** erfolgte durch die langsame Zugabe von DIPEA und PyBOP in DMF bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 16 h. Die säulenchromatographische Reinigung der Rohprodukte mit *n*-Hexan/EtOAc lieferte in meist akzeptablen Ausbeuten die *E64c-like*-Tripeptid-Inhibitoren. Für die Kupplung der Diol- und Epoxy-„Warheads“ wurden geringere Mengen an DIPEA (1.0 eq bzw. 0.9 eq) zugesetzt, um eine mögliche Epimerisierung an den gefährdeten chiralen C $_{\alpha}$ -Atomen zu vermeiden. Die Umsetzung der aliphatischen und aromatischen Warheads gestaltete sich im Vergleich zu den halogenierten, polaren und ionischen Verbindungen unproblematisch.

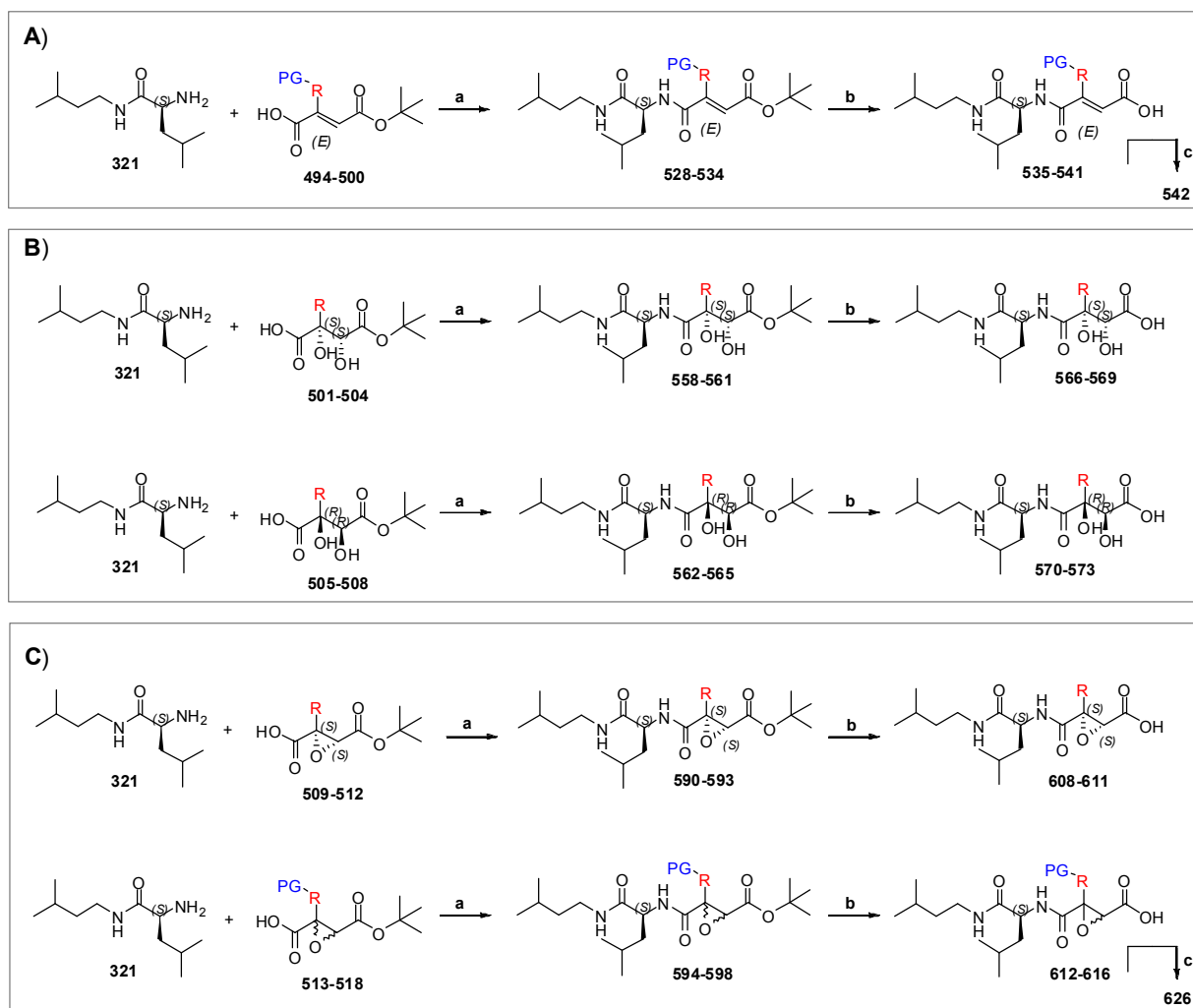


Abbildung 99: Schematische Darstellung der einzelnen Syntheseschritte für die Darstellung der *E64c-like*-Tripeptide. **A)** (a) PyBOP (1.2 eq), DIPEA (1.1 eq), DMF, RT, 16 h; (b) TFA (13 eq), TIPS (2.5 eq), DCM (32 eq), RT, 2 h; (c) LiOH (3.0 eq), THF, 0 °C, 2 h; **B)** (a) PyBOP (1.1 eq), DIPEA (1.0 eq), DMF, RT, 12 h; (b) TFA (13 eq), TIPS (2.5 eq), DCM (32 eq), RT, 2 h; **C)** PyBOP (1.05 eq), DIPEA (0.9 eq), DMF, RT, 16 h; (b) TFA (13 eq), TIPS (2.5 eq), DCM (32 eq), RT, 2 h; (c) LiOH (3.0 eq), THF, 0 °C, 2 h.

Die Ausbeuten für die einzelnen Verbindungen werden aufgrund des enormen Umfangs in diesem Abschnitt nicht detailliert diskutiert, sondern generell anhand einzelner funktioneller Gruppierungen besprochen.^[ii] Die peptidsynthetische Kupplung der aliphatischen und aromatischen (*E*)-Alkene (**494-497**) mit dem *E64c-like*-Dipeptid (**321**) verliefen problemlos, so dass die entsprechenden *E64c-like*-(*E*)-Alken-Tripeptide (**528-531**) in Ausbeuten >60% dargestellt werden konnten. Die peptidsynthetische Darstellung der halogenierten (**532**), polaren (**533**) und sauren *E64c-like*-(*E*)-Alken-Tripeptide blieb mit Ausbeuten von ca. 35% hinter den Erwartungen zurück.

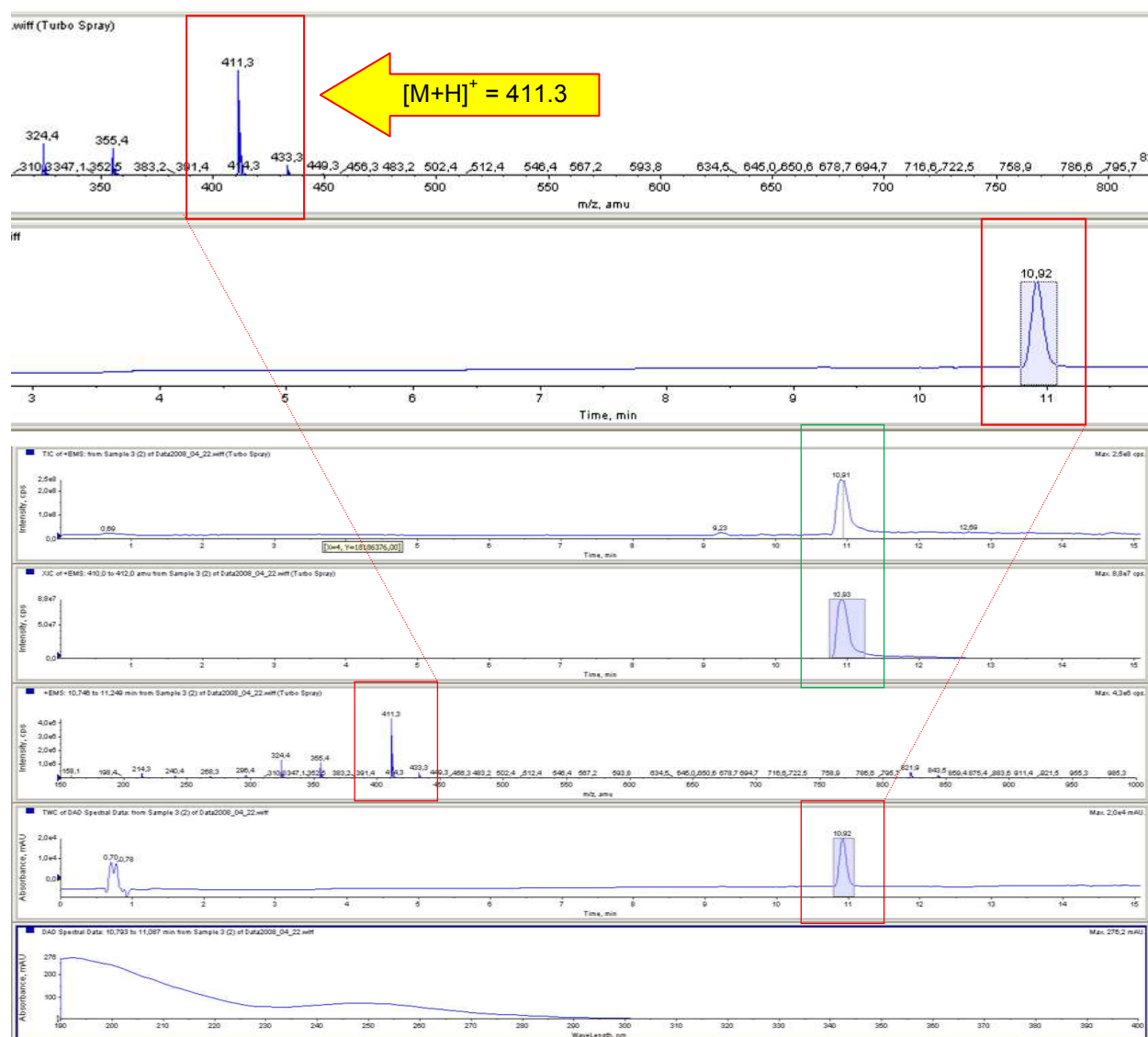


Abbildung 100: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like*-(*E*)-Alken-Leucin-OtBu (**529**); $[M+H]^+ = 411.3$ nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit *n*-Hexan/EtOAc. Die Signale der TIC, XIC und der UV-Spur zeigen die Reinheit der Verbindung an.

^[ii] für Details siehe experimenteller Teil dieser Arbeit.

Während der Synthese der *E64c-like-(E)*-Alken-Tripeptide (**528-542**) wurden keine unerwünschten Nebenreaktionen bzw. die Bildung diastereomerer Verbindungen beobachtet. In Abbildung 100 ist repräsentativ für die Gruppe der geschützten *E64c-like-(E)*-Alkene das HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like-(E)*-Alken-Leucin-OtBu (**529**) nach säulenchromatographischer Reinigung (*n*-Hexan/EtOAc) gezeigt. Die abschließende finale *tert*-Butylester-Entschützung der *E64c-like-(E)*-Alken-Tripeptide verlief nach den schon beschriebenen Standardbedingungen mit TFA/DCM in Anwesenheit von TIPS (Scavenger). Eine säulenchromatographische Aufreinigung der entschützten *E64c-like-(E)*-Alken-Peptide (**535-542**) war nicht notwendig, da nach entsprechender Aufarbeitung mit anschließender Lyophilisation die Verbindungen (**535-542**) in HPLC-MS bzw. NMR-reiner Form erhalten wurden. Siehe dazu die exemplarischen ^1H -NMR-Spektren bzw. das HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like-(E)*-Alken-Leu-OH (**536**) in Abbildung 101 und 102.



Abbildung 101: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like-(E)*-Alken-Leucin-OH (**536**); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 375.2$, nach entsprechender Aufarbeitung und Lyophilisation. Die Signale der TIC, XIC und der UV-Spur zeigen die Reinheit der Verbindung an.

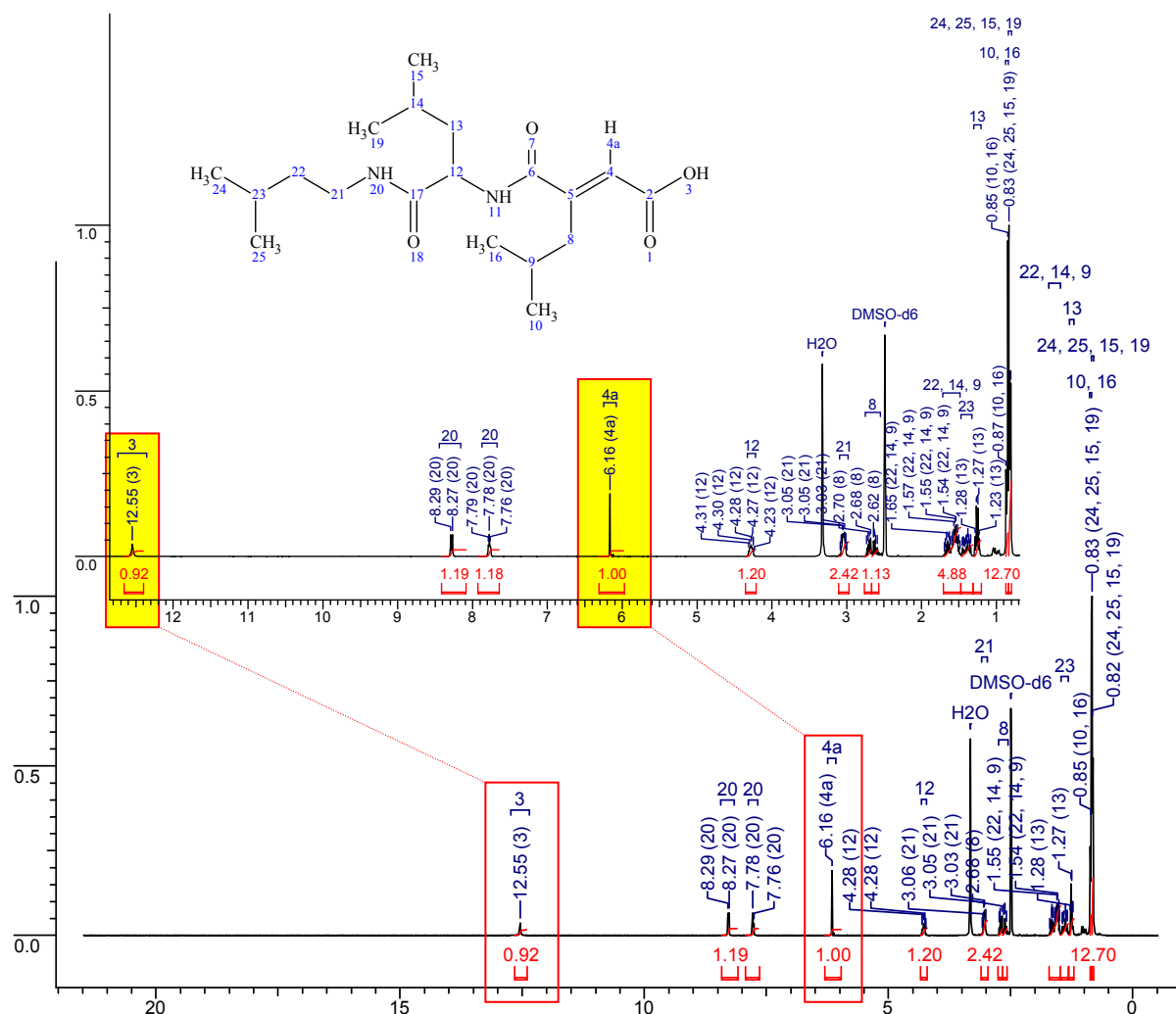


Abbildung 102: Ausschnitte aus dem ^1H -NMR-Spektrum von *E64c-like-(E)*-Alken-Leucin-OH (**536**) in DMSO-d_6 (DMSO Restsignal bei 2.49 ppm; H_2O bei 3.35 ppm). Charakteristisch sind die Signale der Protonen am C-4 der Doppelbindung bei 6.16 ppm Stereozentrum, sowie der entschützten bzw. freien Carboxyfunktion bei 12.55 ppm.

Die Synthese der *E64c-like-(S,S)*- bzw. *-(R,R)*-Diol-Tripeptide erfolgte nach demselben Prinzip wie für die *E64c-(E)*-like-Alkene beschrieben, mittels anschließender säulen-chromatographischer Reinigung mit *n*-Hexan/EtOAc. Einzige Veränderung des Syntheseprotokolls, war der verringerte Zusatz von DIPEA um eine mögliche Epimerisierung an den gefährdeten chiralen C_α -Atomen oder eine mögliche Deprotonierung der Hydroxyfunktionen zu unterdrücken. Die erzielten Kupplungsausbeuten für die geschützten *E64c-like-(S,S)*-Diole (**558-561**) mit durchschnittlich 60% lagen interessanterweise im direkten Vergleich um ca. 10% höher als die für die *E64c-like-(R,R)*-Diole (**562-565**) erzielten Kupplungsausbeuten. Ein möglicher Einfluss der Diol-Stereoinformation auf die Effizienz der Peptidkupplung wurde nicht weiter untersucht. Während der Synthese der *E64c-like*-Diol-Tripeptide kam es nur geringfügig zur Bildung unerwünschter Diastereomere, die Aufgrund unterschiedlicher

enantiomerer Überschüsse der eingesetzten (S,S)- bzw. (R,R)-Diol auftraten. Hauptsächlich bei der Kupplung von (R,R)-Diol-Leu-OtBu (**506**) und (R,R)-Diol-Phe-OtBu (**508**) mit dem Dipeptid (**321**) in die entsprechenden *E64c-like*-(R,R)-Diol-, -Leu (**563**) bzw. -Phe (**565**) wurde eine partielle Bildung von Diastereomeren beobachtet (<15%), die während der säulenchromatographischen Aufreinigung abgetrennt wurden. In Abbildung 103 und 104 ist repräsentativ für die geschützten *E64c-like*-Diol ein HPLC-ESI-MS-Chromatogramm bzw. ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von *E64c-like*-(R,R)-Diol-Leu-OtBu (**563**) dargestellt. Die abschließende Verseifung des *tert*-Butylesters erfolgte wie schon für die *E64c-like*-Alkene mit TFA/DCM in Anwesenheit von TIPS. Die entschützten (S,S)- und (R,R)-*E64c-like*-Diol-Tripeptide (**566-573**) wurden nach der Aufarbeitung und anschließender Gefriertrocknung in reiner Form in Ausbeuten >70% erhalten. Siehe dazu in Abbildung 105 das exemplarische HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like*-(R,R)-Diol-Leu-OH (**571**).



Abbildung 103: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like*-(R,R)-Diol-Leucin-OtBu (**563**); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 445.3$ nach säulenchromatographischer Aufreinigung mittels *n*-Hexan/EtOAc.

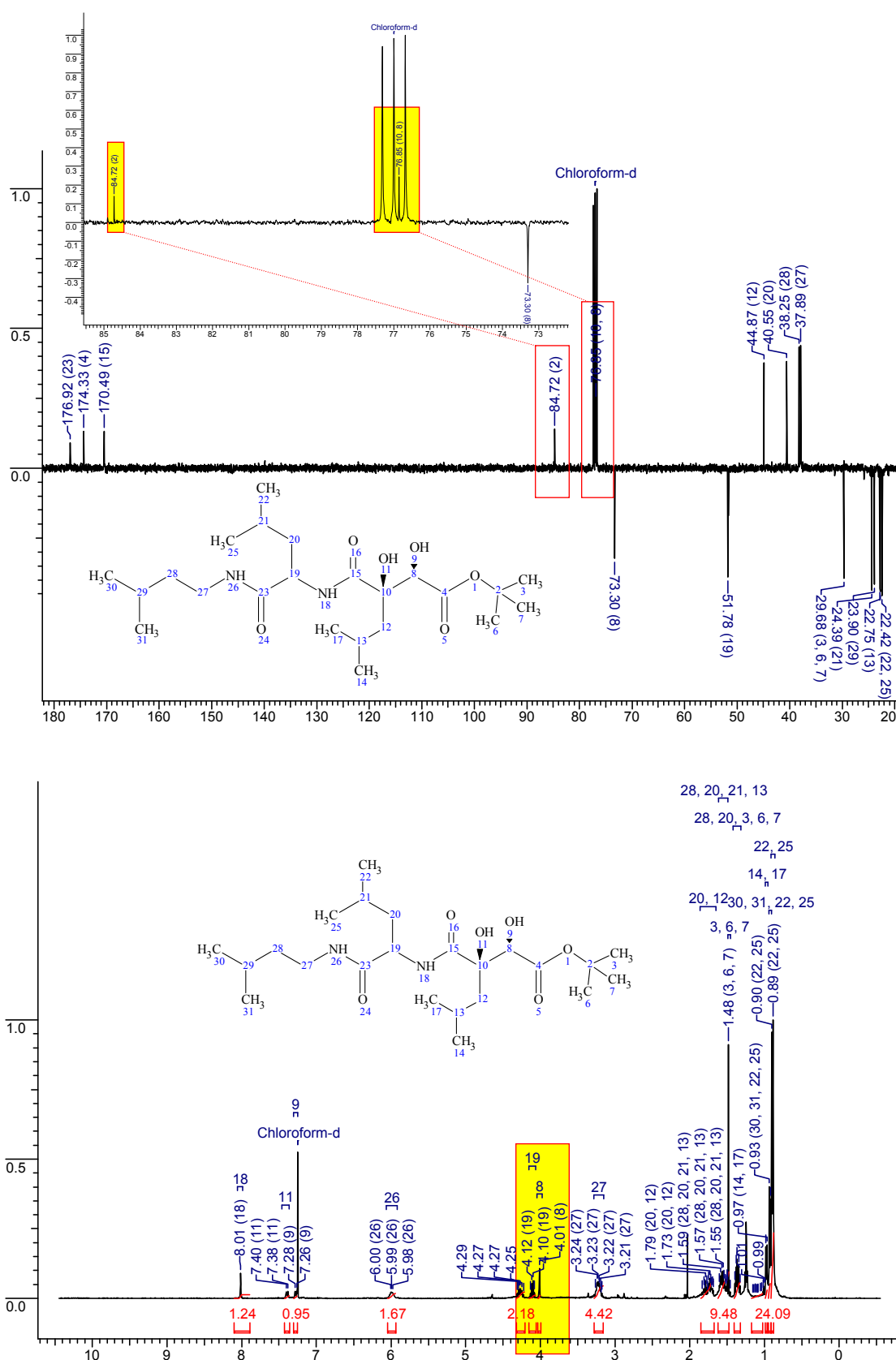


Abbildung 104: Ausschnitte aus dem ¹³C- bzw. ¹H-NMR-Spektrum von *E64c-like-(R,R)*-Diol-Leucin-OtBu (**536**) in CDCl₃ (CDCl₃ Restsignal bei 7.25 ppm bzw. 77.0 ppm). Charakteristisch sind die Signale des Protons am C-8 Kohlenstoffatom (Stereozentrum), bei 4.10 ppm, sowie die Signale der Kohlenstoffatome C-8 (76.9 ppm) und C-10 (84.7 ppm).

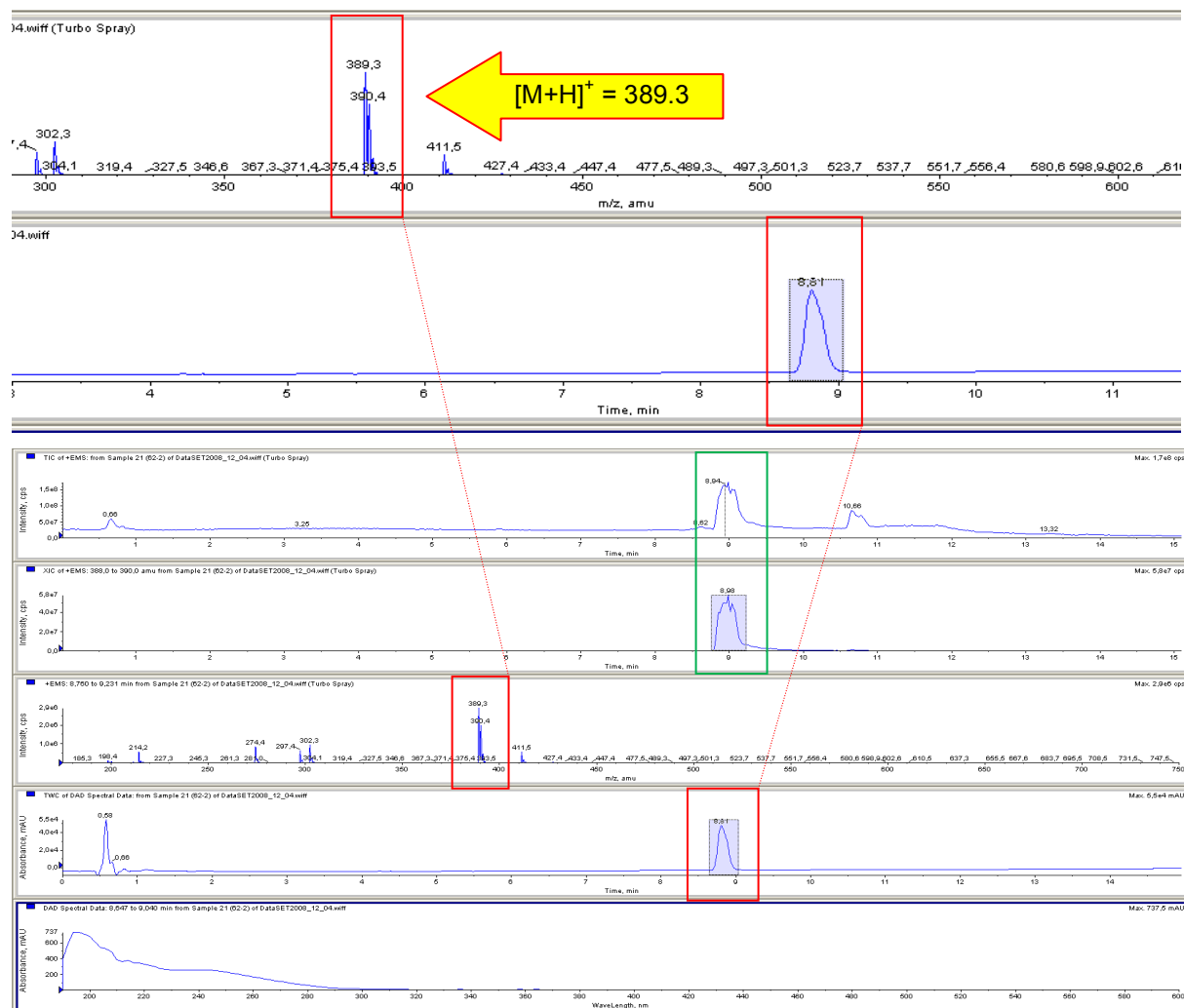


Abbildung 105: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like*-(*R,R*)-Diol-Leucin-OH (**571**); $[M+H]^+ = 389.3$, nach entsprechender Aufarbeitung und Lyophilisation. Die Signale der TIC, XIC und der UV-Spur zeigen die Reinheit der Verbindung an.

Für die peptidsynthetische Kupplung der Epoxy-„Warheads“ (**509-518**) wurde DIPEA (0.9 eq) in geringem Unterschuss eingesetzt, da eine mögliche Epimerisierung am Oxiran- C_α unbedingt unterdrückt werden sollte. Die Synthese der aliphatischen und aromatischen *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Tripeptide (**590-593**) verlief ohne Bildung unerwünschter Diastereomere, was auf die hohe Enantiomerenreinheit der eingesetzten (*S,S*)-Epoxide-OtBu (**509-512**) und die relativ milden Reaktionsbedingungen zurückzuführen ist. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit *n*-Hexan/EtOAc und anschließender Lyophilisation wurden die geschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Tripeptide (**590-593**) in Ausbeuten >50% erhalten. In Abbildung 106 ist exemplarisch das HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Ala-OtBu (**590**) nach erfolgter säulenchromatographischer Reinigung mit *n*-Hexan/EtOAc gezeigt.

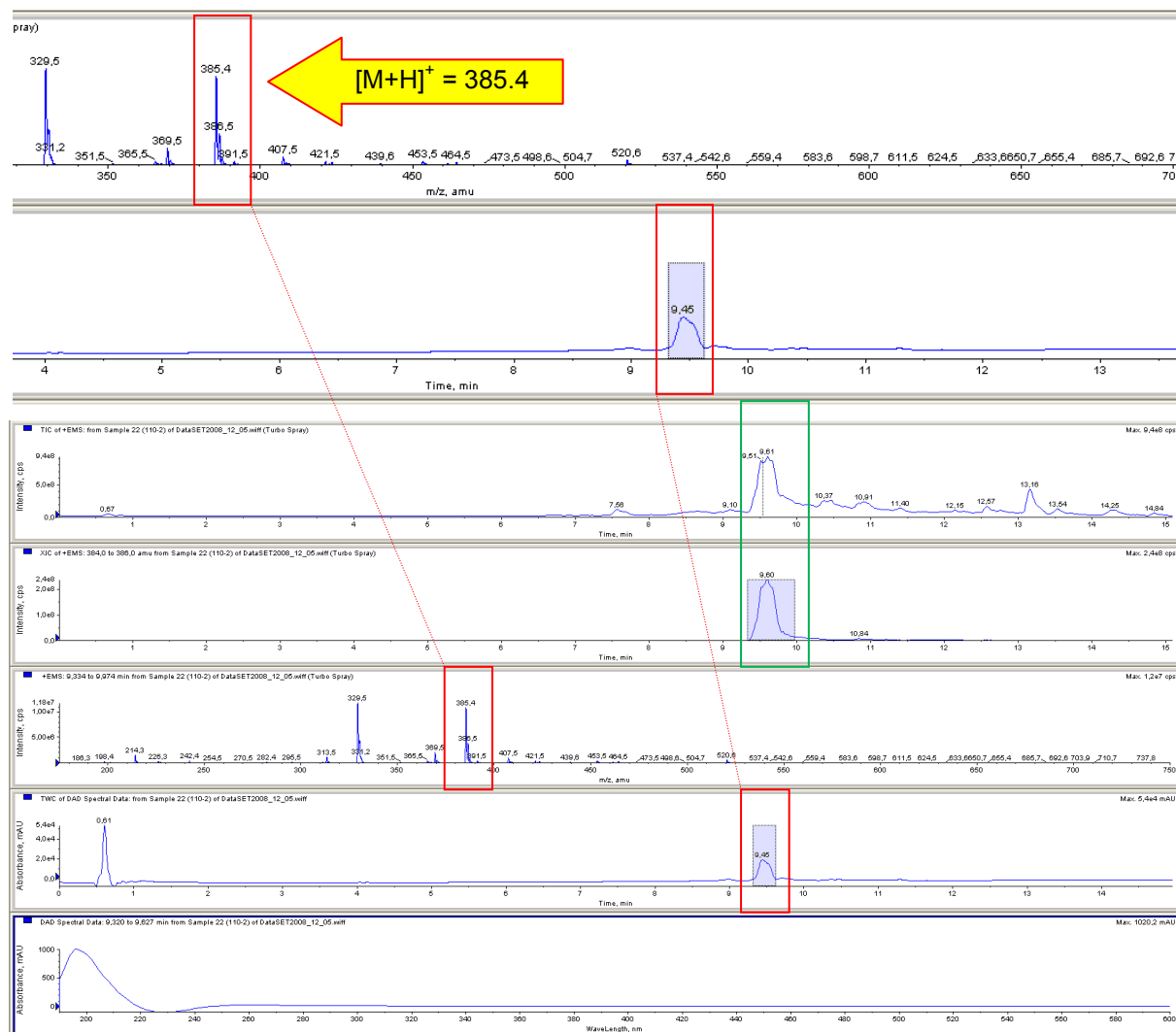


Abbildung 106: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Ala-OtBu (**590**); $[M+H]^+ = 385.4$.

Die Umsetzung der racemischen *trans*-Epoxyde (**513-518**) erfolgte analog dem oben beschriebenen Protokoll, wobei die Bildung von diastereomeren (*S,S,S*)- bzw. (*S,R,R*)-*E64c-like*-Epoxy-Tripeptiden aufgrund der eingesetzten enantiomeren-Mischungen der *trans*-Epoxyde (**513-518**) erwartet wurde. Eine Trennung der enantiomeren (*S,S,S*)-Verbindungen von dem entstanden (*S,R,R*)-Diastereomer wurde aufgrund unzureichender Bestimmung der absoluten Konfiguration nicht unternommen. Die Kupplungsausbeuten für die halogenierten (**594**), cyclischen (**595**) und polaren (**596**) *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy-Tripeptide mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 40% blieben nur geringfügig hinter denen der enantiomerenreinen *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Tripeptiden zurück. In Abbildung 107 und 108 ist das ^{13}C -NMR-Spektrum bzw. HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OtBu (**594**) dargestellt. Die Darstellung von *E64c-like*-Epoxy-Asp-OtBu (**597**) und Epoxy-Trp-OtBu (**598**) gestaltet sich schwierig, was sich in den Kupplungsausbeuten von 35% bzw.

28%, entsprechend wiedergespiegelt. Eine mögliche Ursache für den Einbruch der erzielten Kupplungsausbeuten kann für das Epoxy-Asp-Derivat (**597**) möglicherweise auf die zusätzliche Carbonylseitenkette zurückgeführt werden, wobei im Fall des Epoxy-Trp-Derivats (**598**) wahrscheinlich der sterische Anspruch der Indolfunktion und deren zusätzlichen Tosyl-Schutzgruppe verantwortlich sind. Die abschließenden *tert*-Butylester-Verseifungen erfolgten nach dem schon mehrfach erwähnten Protokoll (TFA/DCM), wobei die Methylester geschützte Seitenkette von *E64c-like*-Epoxy-Asp-OH (**615**) mit LiOH (0.5 M) in THF bei 0 °C entschützt wurde.^[iii] Nach abschließender Reinigung und Lyophilisation konnten die entschützten *E64c-like*-(*S,S*) bzw. -(*rac*)-Epoxy-Tripeptide (**608-616, 626**) in Ausbeuten von durchschnittlich 60% dargestellt werden. Die Bestimmung der biologischen Aktivitäten der *E64c-like*-Tripeptide sollte sowohl für die Säure- als auch für die Ester-Derivate erfolgen.

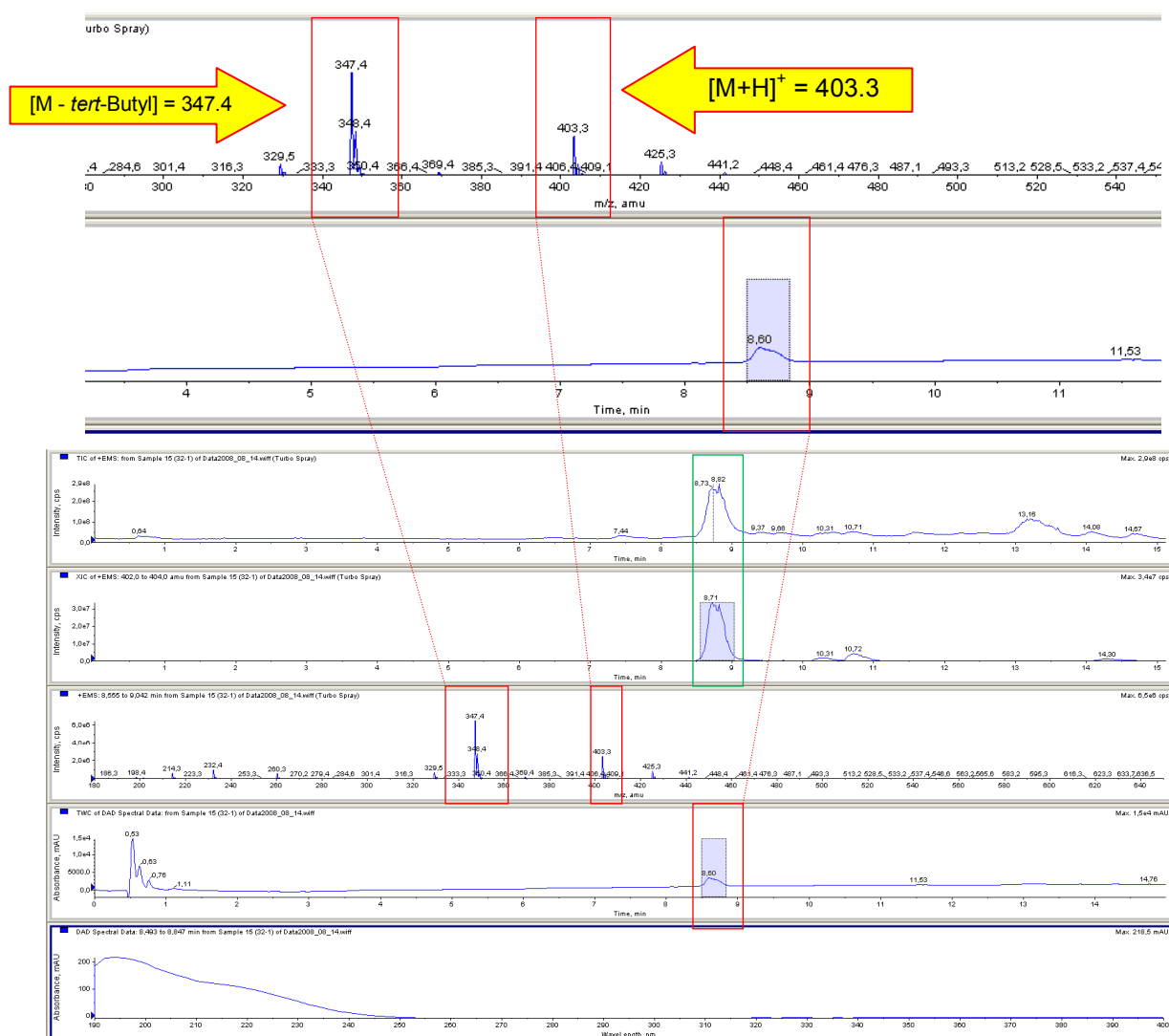


Abbildung 107: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OtBu (**594**); $[M+H]^+ = 403.3$; nach säulenchromatographischer Aufreinigung mittels *n*-Hexan/Diethylether.

^[iii] für Details siehe experimenteller Teil dieser Arbeit.

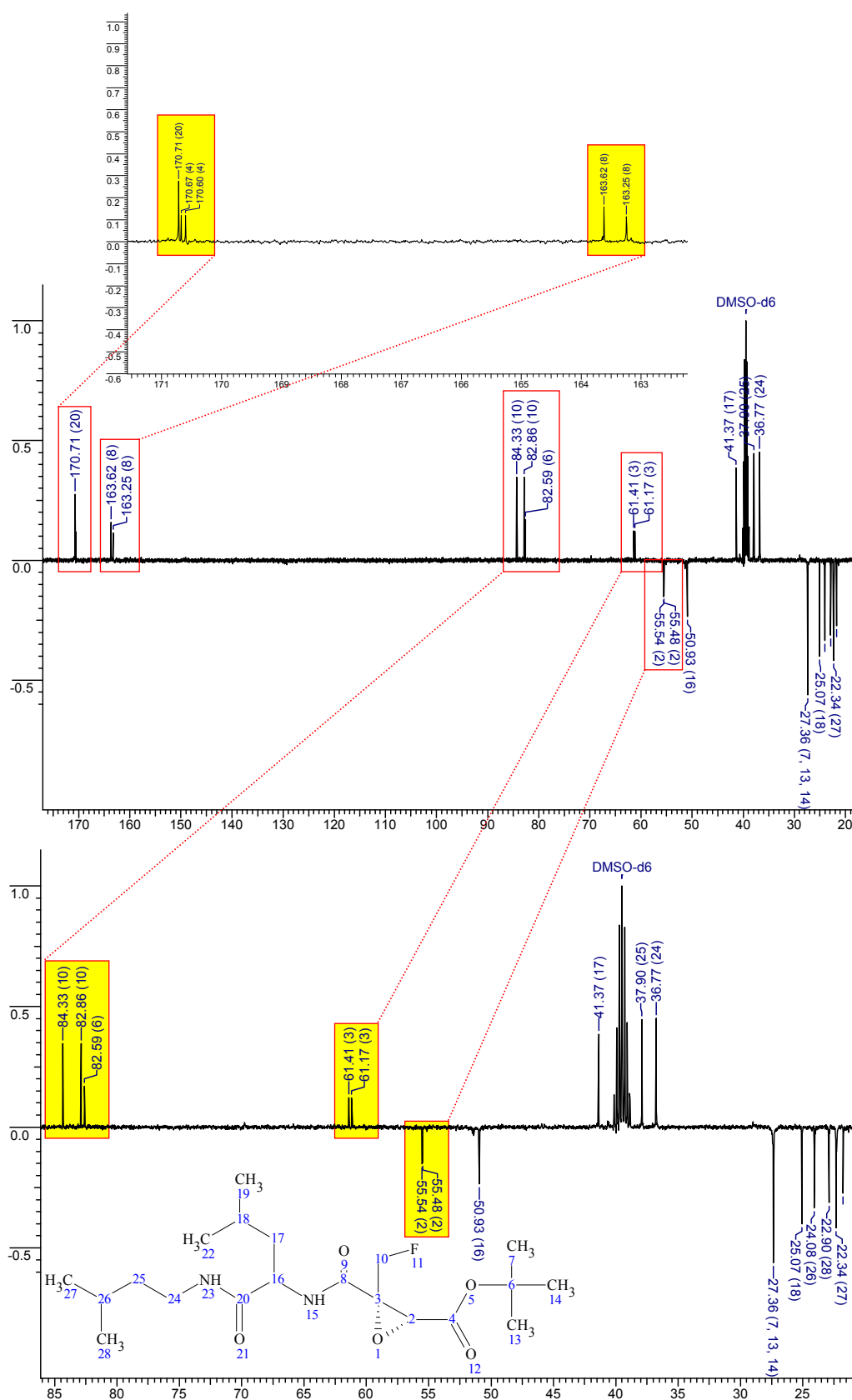


Abbildung 108: Ausschnitte aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von *E64c-like-(rac)*-Epoxy- β -Fluor-Ala-OtBu (**594**) in DMSO-d_6 (DMSO Restsignal bei 49.5 ppm). Charakteristisch für die fluorierte Verbindung sind die Signal der Kohlenstoffatome an C-2 und C-3 des Oxiranrings bei 55.48, 55.54 ppm bzw. 61.17 und 61.41 ppm.

4.2.5.2 Synthese der CA028-like-Tripeptide

Die peptidsynthetische Umsetzung des CA028-like-Dipeptids **326** mit den „Warheads“ (Alken, Diol, Epoxid) in die entsprechenden CA028-like-Alken-, Diol-, und Epoxy-Tripeptide erfolgte analog dem zuvor beschriebenen Protokoll für die E64c-like-Tripeptide. Die beiden Protokolle unterschieden sich ausschließlich in den eingesetzten Reaktantenäquivalenten. Für die Darstellung der CA028-like-(E)-Alken-Tripeptide (Abbildung 110) wurde zu einer Lösung von (E)-Alken-OMe (**470-476**) in DMF langsam bei Raumtemperatur DIPEA (1.1 eq), Dipeptid **326** in DMF, sowie PyBOP (1.4 eq) zugesetzt und für 16 h gerührt. Eine anschließende säulenchromatographische Reinigung der Rohprodukte mittels *n*-Hexan/ Ethylacetat und folgender Lyophilisation ergab für die synthetisierten CA028-like-(E)-Alken-Tripeptide (**543-547**) zufriedenstellende Kupplungsausbeuten von durchschnittlich 65%, wobei auch in diesem Fall wie schon bei der Darstellung der E64c-like-(E)-Alken-Tripeptide die halogenierten (**548**), polaren (**549**) und sauren (**550**) Verbindungen eine verminderte Ausbeuten von ca. 40% aufwiesen.

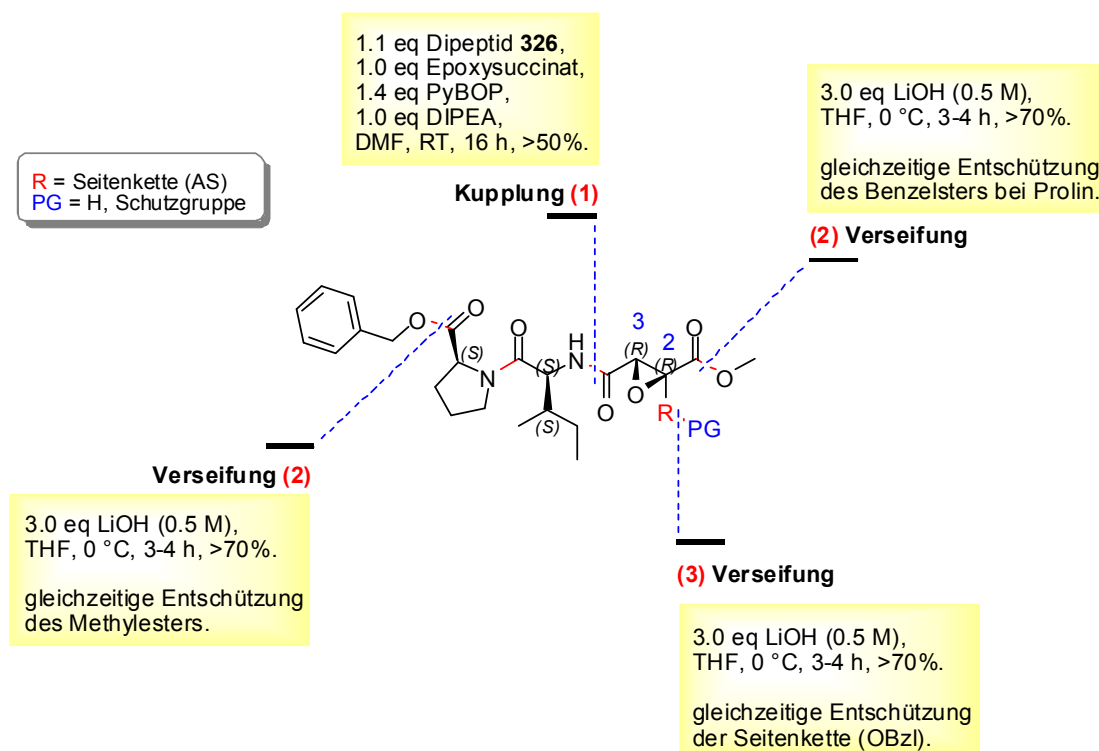


Abbildung 109: Schematische Darstellung der Syntheschnitte durch ein CA028-like-Tripeptid. (1) Kupplung des Dipeptids **326** mit einem entsprechenden „Warheads“ (Alken, Diol oder Epoxid) und einer anschließenden finalen Verseifung der permanenten Schutzgruppen mit Lithiumhydroxid in THF (2) und (3).

Während der Synthese der *CA028-like-(E)*-Alken-Tripeptide (**543-550**) konnte mit Dünnschichtchromatographie bzw. HPLC-ESI-MS-Analyse keine unerwünschte Bildung von Diastereomeren beobachtet werden. In Abbildung 111 und 112 ist repräsentativ für die *CA028-like-(E)*-Alkene das HPLC-ESI-MS-Chromatogramm bzw. die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von *CA028-like-(E)*-Alken-Phe-OMe (**547**) nach chromatographischer Reinigung (*n*-Hexan/EtOAc) wiedergegeben.

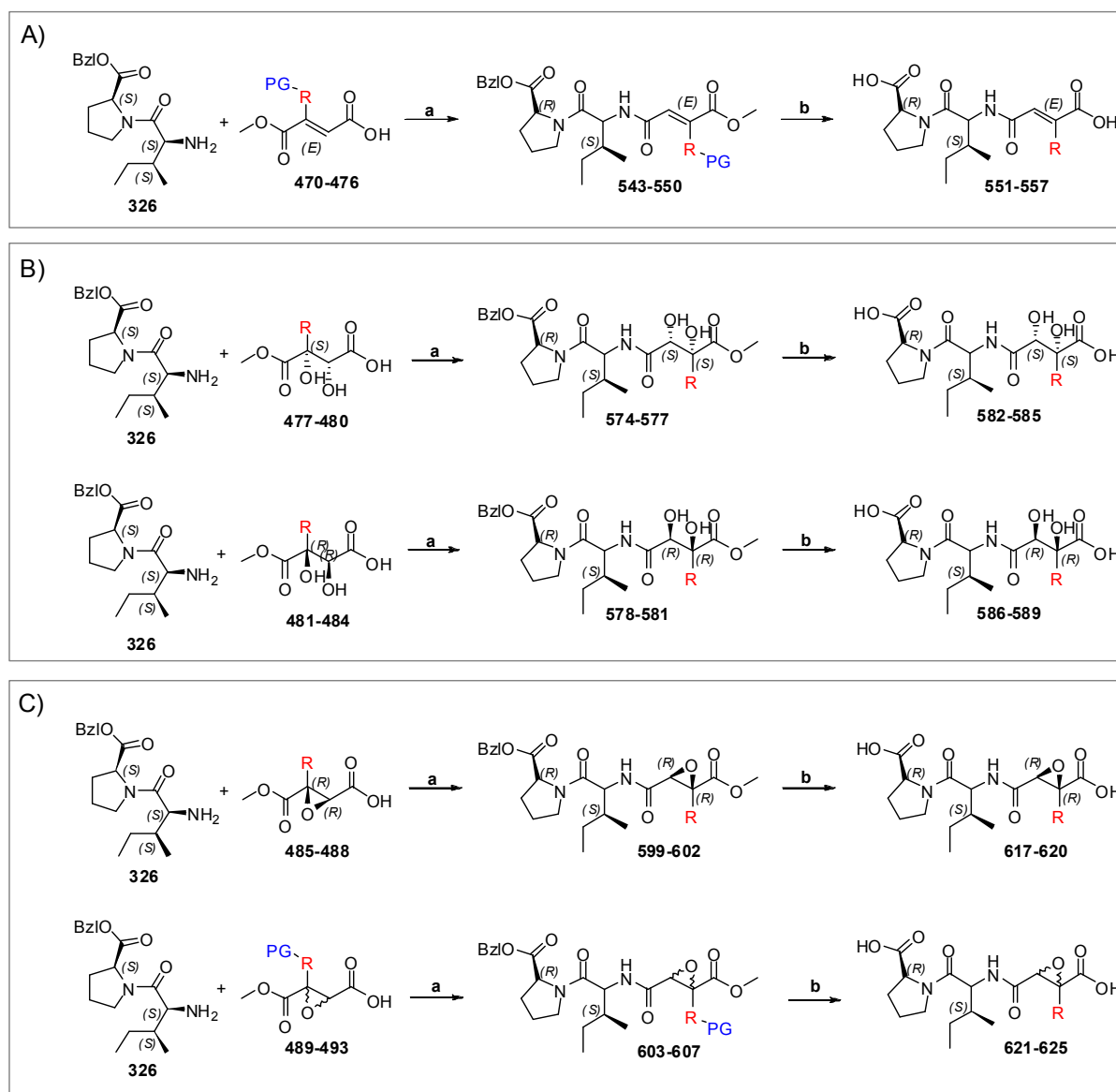


Abbildung 110: Schematische Darstellung der einzelnen Syntheseabschnitte für die Darstellung der *CA028-like*-Tripeptide. **A)** Alkene: a) PyBOP (1.4 eq), DIPEA (1.0 eq), DMF, RT, 16 h; b) LiOH (3.0 eq), THF, 0 °C, 2 h; **B)** Diole: a) PyBOP (1.6 eq), DIPEA (1.0 eq), DMF, RT, 12 h; (b) LiOH (3.0 eq), THF, 0 °C, 2 h; **C)** Epoxide: a) PyBOP (1.2 eq), DIPEA (0.9 eq), DMF, RT, 10 h; b) LiOH (3.0 eq), THF, 0 °C, 2 h.

Die parallele Verseifung der Benzyl- bzw. Methylester der *CA028-like-(E)*-Alken-Tripeptide (**551-556**) erfolgte mittels LiOH (3 eq, 0.5 M) in THF bei 0 °C innerhalb 2 h. Eigens für die finale Entschützung des seitenkettengeschützten Aspartat-Derivats **557** wurde die doppelte Menge an LiOH eingesetzt. Nach anschließender Aufarbeitung, Reinigung und Lyophilisation konnten die entschützten *CA028-like-(E)*-Alkene-OH (**551-557**) in Ausbeuten von bis zu 75% enantiomerenrein dargestellt werden. In Abbildung 113 ist das HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *CA028-like-(E)*-Alken-Phe-OH (**554**) repräsentativ für die Alken-Derivate wiedergegeben.



Abbildung 111: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *CA028-like-(E)*-Alken-Phe-OMe (**547**); $[M+H]^+ = 521.5$. nach Säulenchromatographischer Aufreinigung nach mit *n*-Hexan/EtOAc. Die Signale der TIC, XIC und der UV-Spur zeigen die Reinheit der Verbindung an. Die Signalhügel im TIC-Chromatogramm sind auf eine schlechte bzw. verminderte Ionisierung zurückzuführen.

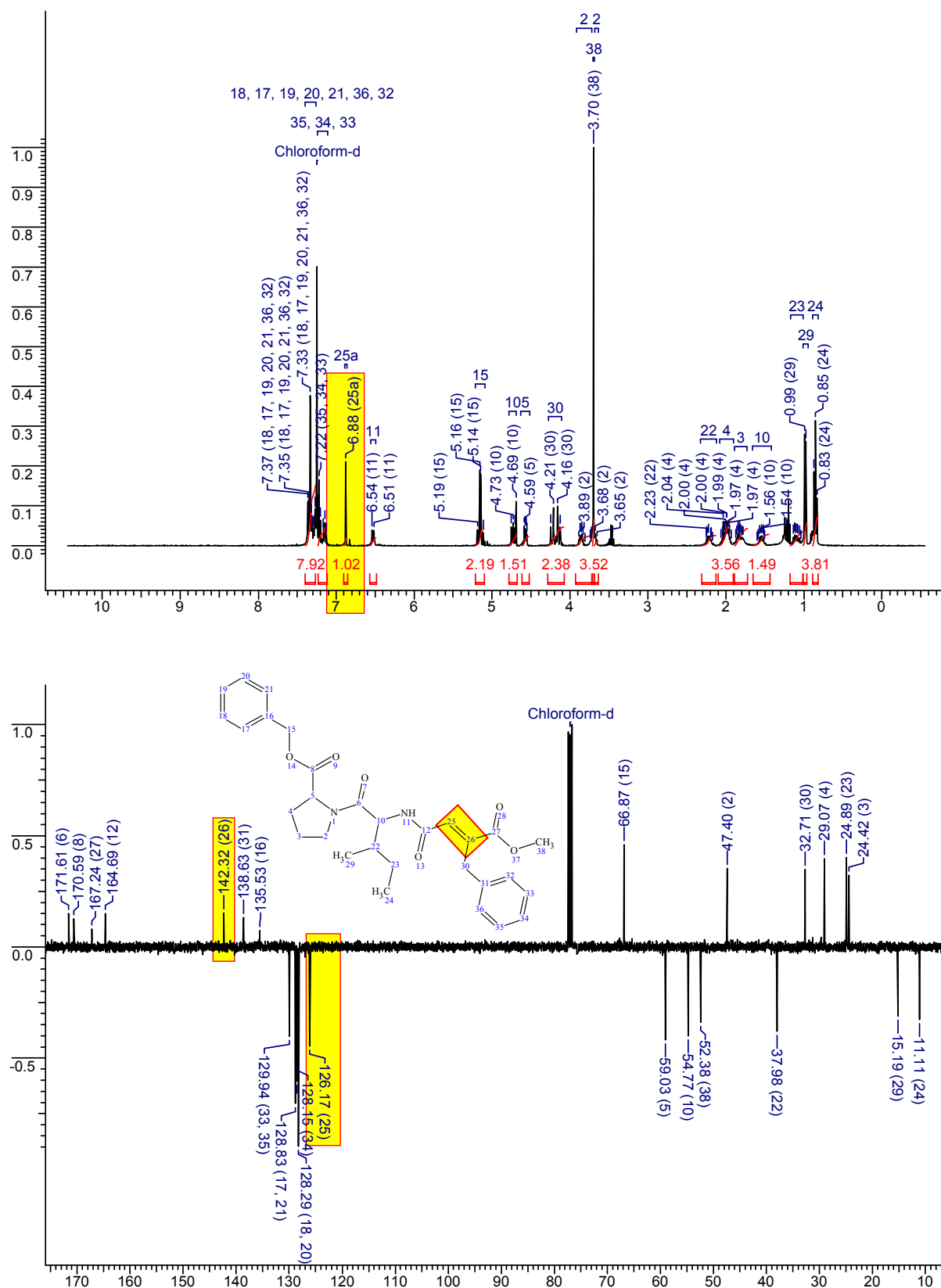


Abbildung 112: Ausschnitte aus dem ¹H- bzw. ¹³C-NMR-Spektrum von CA028-like-(E)-Alken-Phe-OMe (**547**) in CDCl₃ (CDCl₃ Restsignal bei 77.0 ppm). Charakteristisch für das ungesättigte **547** sind die Signale der Kohlenstoffatome an C-25 und C-26 der Doppelbindung bei 135.5 ppm bzw. 142.3 ppm sowie das Proton an C-25 bei 6.88 ppm.

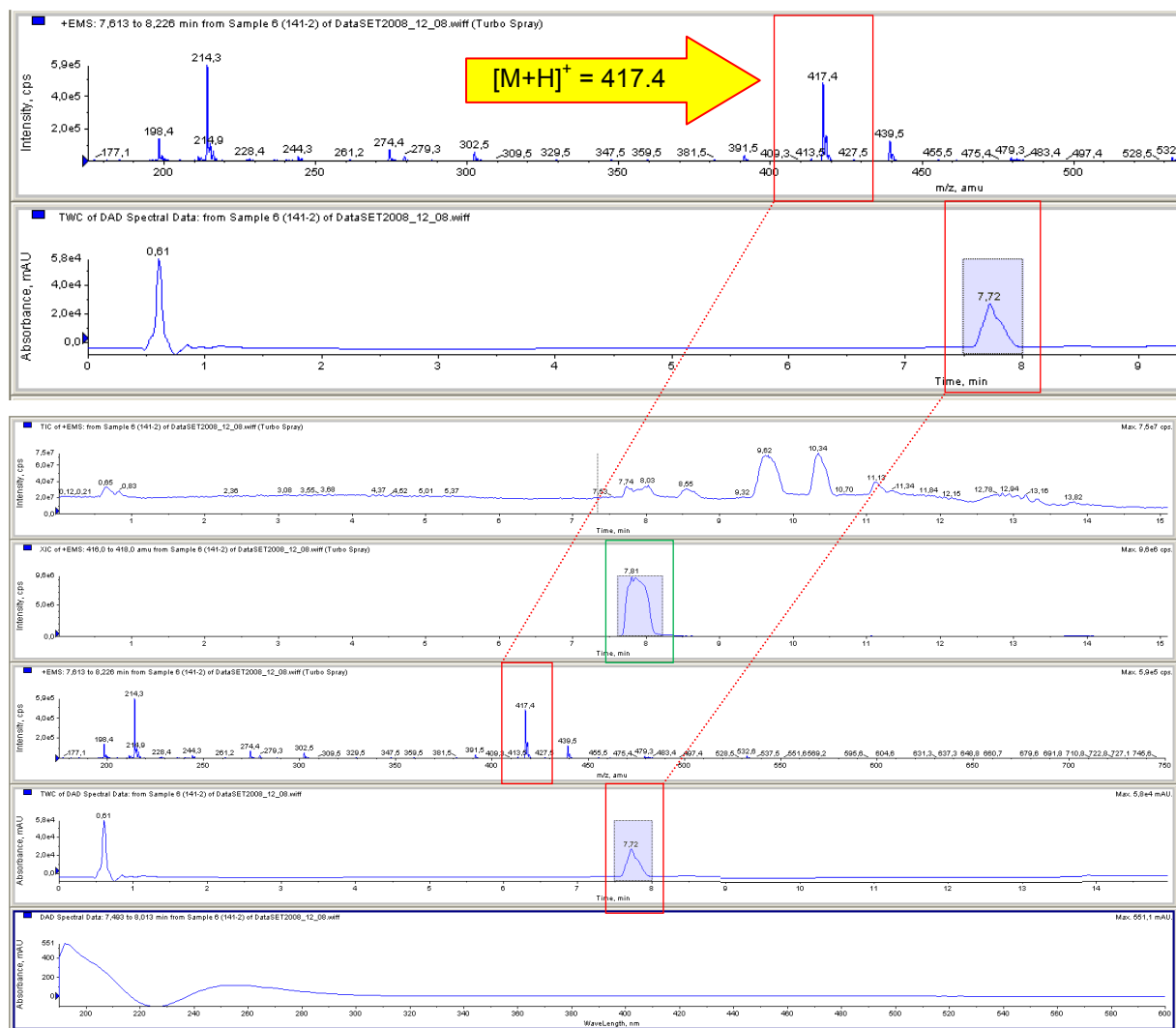


Abbildung 113: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *CA028-like-(E)-Alken-Phe-OH* (**554**); $[M+H]^+ = 417.4$. Die Signale der XIC und der UV-Spur zeigen die Reinheit der Verbindung an. Die Signalhügel im TIC-Chromatogramm sind auf eine schlechte bzw. verminderte Ionisierung zurückzuführen.

Die Synthese der *CA028-like-(S,S)- und -(R,R)-Diol-Tripeptide* (Abbildung 110) erfolgte nach demselben Konzept wie bereits oben für die Darstellung der *CA028-like-(E)-Alkene* beschrieben mit anschließender chromatographischer Aufreinigung (*n*-Hexan/EtOAc) und Gefriertrocknung. Auch in diesem Fall wurde eine geringere Menge an DIPEA (1.0 eq) der Reaktionslösung zugesetzt um eine mögliche Epimerisierung der gefährdeten chiralen C $_{\alpha}$ -Atome zu vermeiden. Die erzielten Kupplungsausbeuten für die *CA028-like-(S,S)-Diol-Tripeptide* (**574-577**) mit durchschnittlich 65% lagen interessanterweise wie auch schon bei der Synthese der *E64c-like-Diol-Peptide* um ca. 10% höher als die der *CA028-like-(R,R)-Diol-Peptide* (**578-581**). Unter dem Aspekt, dass dieses Phänomen in genau der gleichen Weise auch schon für die *E64c-like-Diol-Peptide* beobachtet wurde kann ein direkter Einfluss

der Stereoinformation der eingesetzten (*S,S*)- (**477-480**) bzw. (*R,R*)-Diol (**481-484**) hinsichtlich der Kupplungseffizienz nicht ausgeschlossen werden. Bei der Synthese der CA028-like-Diol-Tripeptide kam es teilweise zur Bildung unerwünschter Diastereomere während der Umsetzung von (*R,R*)-Diol-Leu-OMe (**482**) bzw. (*R,R*)-Diol-Phe-OMe (**484**) mit dem Dipeptid (**326**) zu den entsprechenden Tripeptiden **579** und **581**. Die unerwünschten Diastereomere wurden während der säulenchromatographischen Aufreinigung abgetrennt. In Abbildung 114 bzw. 115 sind exemplarisch für die Gruppe der CA028-like-Diol-Peptide das HPLC-ESI-MS-Chromatogramm bzw. Ausschnitte aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von CA028-like-(*R,R*)-Diol-Phe-OMe (**581**) wiedergegeben. Die abschließende Verseifung der permanenten Schutzgruppen erfolgte analog wie auch schon für die CA028-like-(*E*)-Alken-Tripeptide mittels LiOH/THF (Abbildung 110). Die entschützten CA028-like-(*S,S*)- und (*R,R*)-Diol-Peptide (**582-589**) konnten nach Aufarbeitung, Reinigung und Lyophilisation enantiomerenrein mit Ausbeuten von durchschnittlich 70% dargestellt werden.

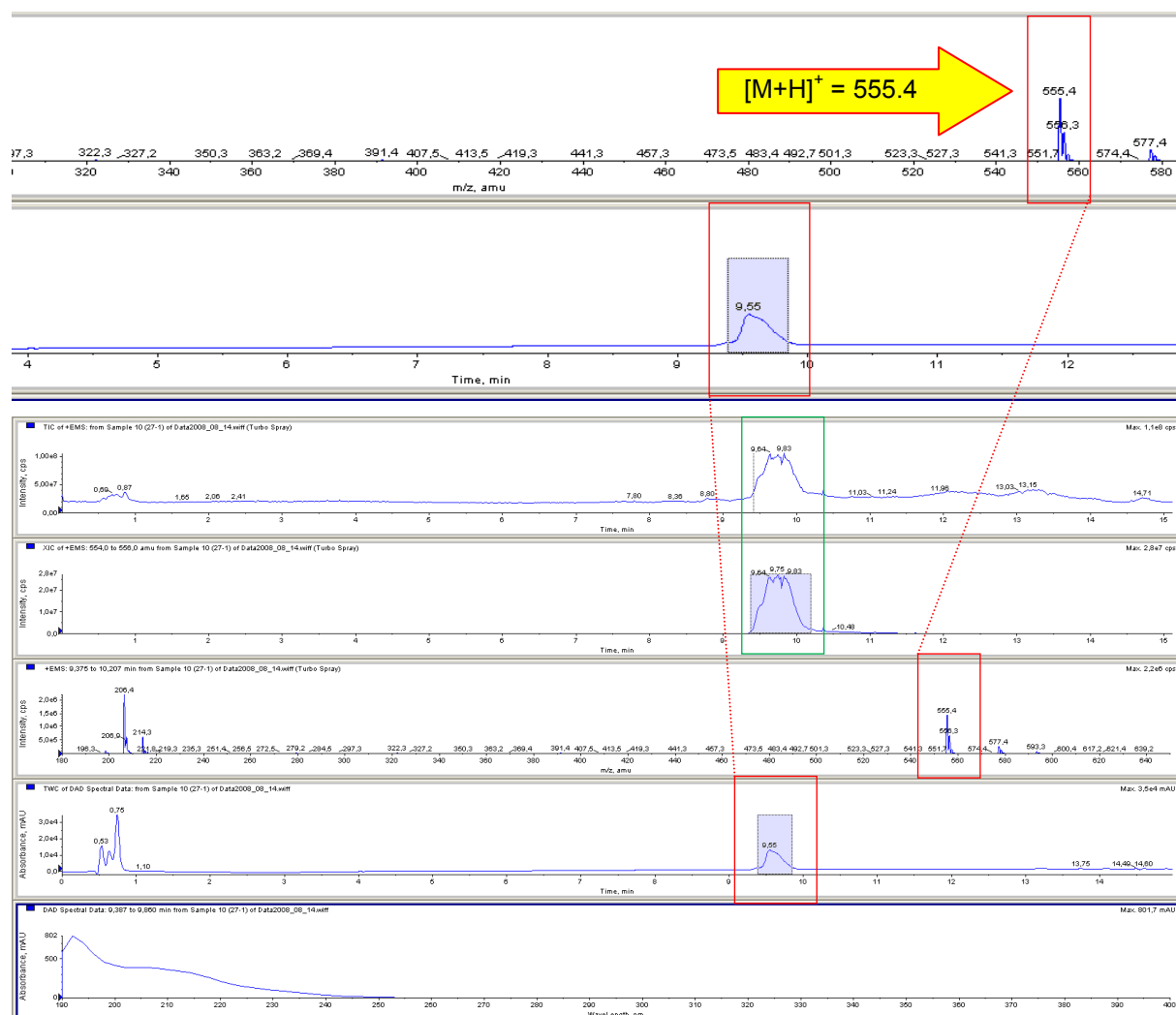


Abbildung 114: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von CA028-like-(*R,R*)-Diol-Phe-OMe (**581**); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 555.4$.

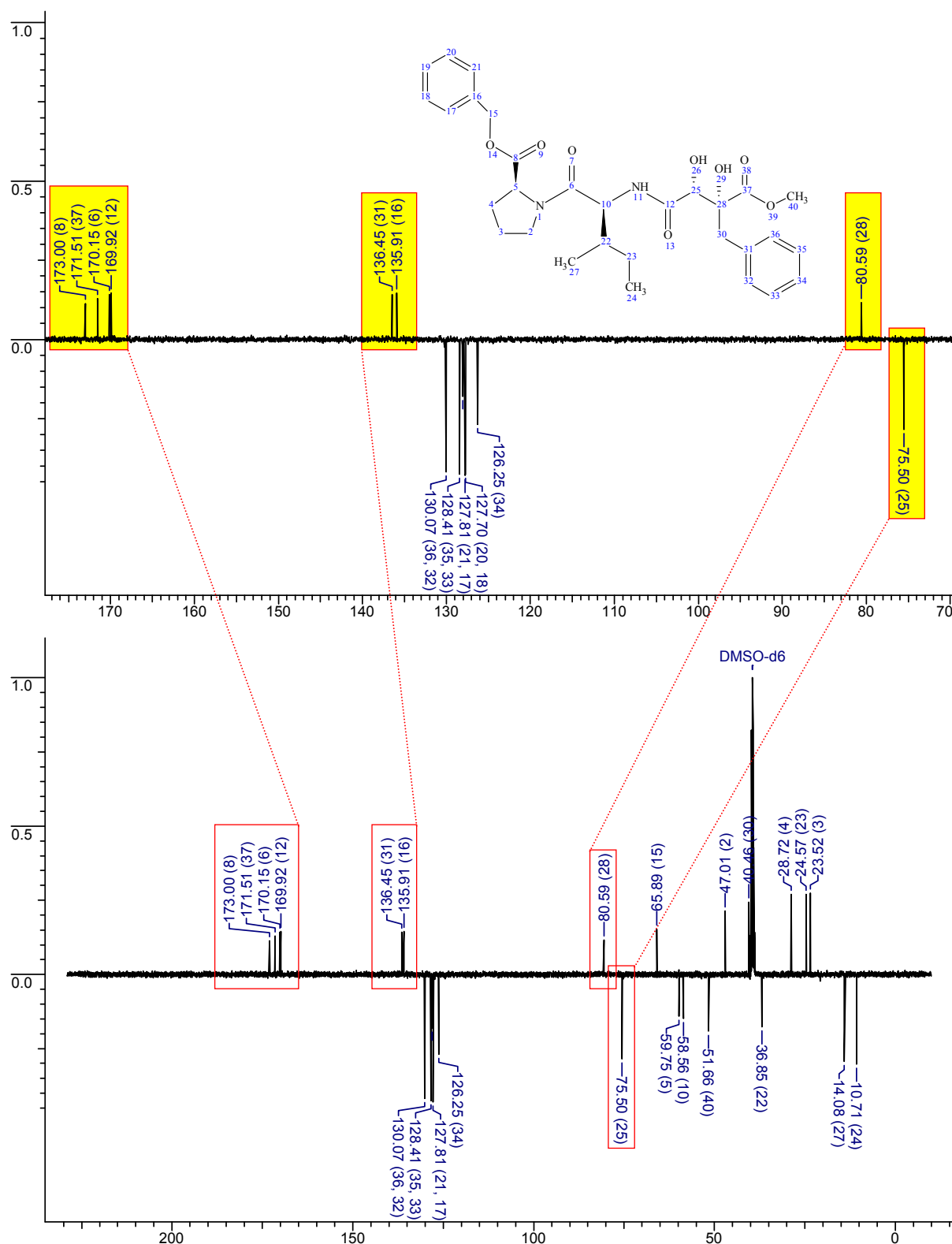


Abbildung 115: Ausschnitte aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von *CA028-like-(R,R)*-Diol-Phe-OMe (**581**) in DMSO-d_6 (DMSO Restsignal bei 49.5 ppm). Charakteristisch für das Diol-Peptid **581** sind die Signale der chiralen Kohlenstoffatome C-25 und C-28 bei 75.5 ppm bzw. 80.6 ppm, sowie die beiden quartären Kohlenstoffatome der Aromaten C-16 und C-31 bei 135.9 ppm bzw. 136.5 ppm und der vier quartären Kohlenstoffatome der Carbonylgruppen.

Für die Kupplung der Epoxy-„Warheads“ (**485-493**) mit dem *CA028-like*-Dipeptid (**326**) wurde wie auch schon für die Synthese der *E64c-like*-Epoxy-Tripeptide, DIPEA (0.9 eq) in geringem Unterschuss eingesetzt um eine Epimerisierung am C α -Atom des Oxiranrings zu unterdrücken. Bedingt durch die geringeren enantiomeren Überschüsse der eingesetzten (*R,R*)-Epoxyde (**485-488**) kam es während der Darstellung der *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Peptide (**599-602**) teilweise zur Bildung unerwünschter Diastereomere, wobei diese durch eine angemessene chromatographische Aufreinigung abgetrennt werden konnten. Nach anschließender Gefriertrocknung der *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Peptide konnten trotz der gebildeten Diastereomere noch Ausbeuten >60% erhalten werden. In Abbildung 116 ist exemplarisch für die *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Tripeptide das HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Phe-OMe (**602**) nach chromatographischer Reinigung und Lyophilisation gezeigt.

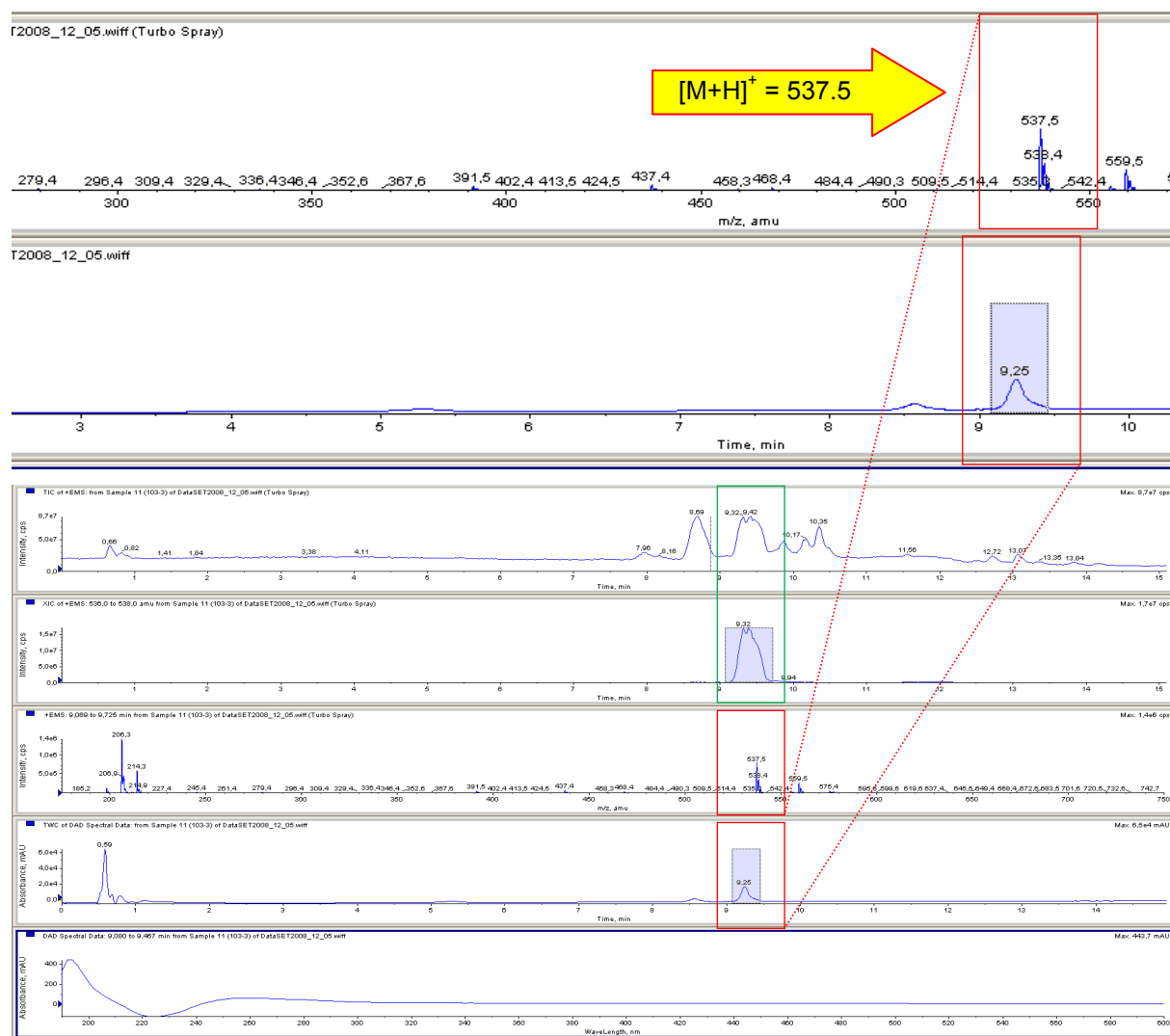


Abbildung 116: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Phe-OMe (**602**); $[M+H]^+ = 537.5$.

Die Umsetzung der racemischen Epoxide (**489-493**) mit Dipeptid **326** erfolgte analog dem oben beschriebenen Protokoll. Die Bildung von Diastereomeren (*S,S,S,S*) und (*S,S,R,R*) konnte aufgrund der eingesetzten Epoxy-Racemate (**489-493**) nicht vermieden werden. Eine anschließende Trennung der unerwünschten enantiomeren (*S,S,S,S*)-Verbindungen von dem eigentlichen (*S,S,R,R*)-Diastereomer wurde unter dem Hintergrund einer unklaren absoluten Konfiguration der jeweiligen Verbindungen nicht unternommen. Die Kupplungs- ausbeuten für die halogenierten (**603**), zyklischen (**604**, **605**) und polaren (**606**) Verbindungen lagen mit durchschnittlich 45% nur geringfügig hinter denen der enantiomerenreinen *CA028-like-(R,R)*-Epoxy-Tripeptide zurück. In den Abbildungen 117 und 118 sind repräsentativ für die racemischen *CA028-like*-Epoxy-Peptide das HPLC-ESI-MS-Chromatogramm bzw. die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von *CA028-like-(rac)*-Epoxy-Cha-OME (**605**) dargestellt.



Abbildung 117: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von *CA028-like-Epoxy-(rac)*-Cha-OME (**605**); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 543.4$.

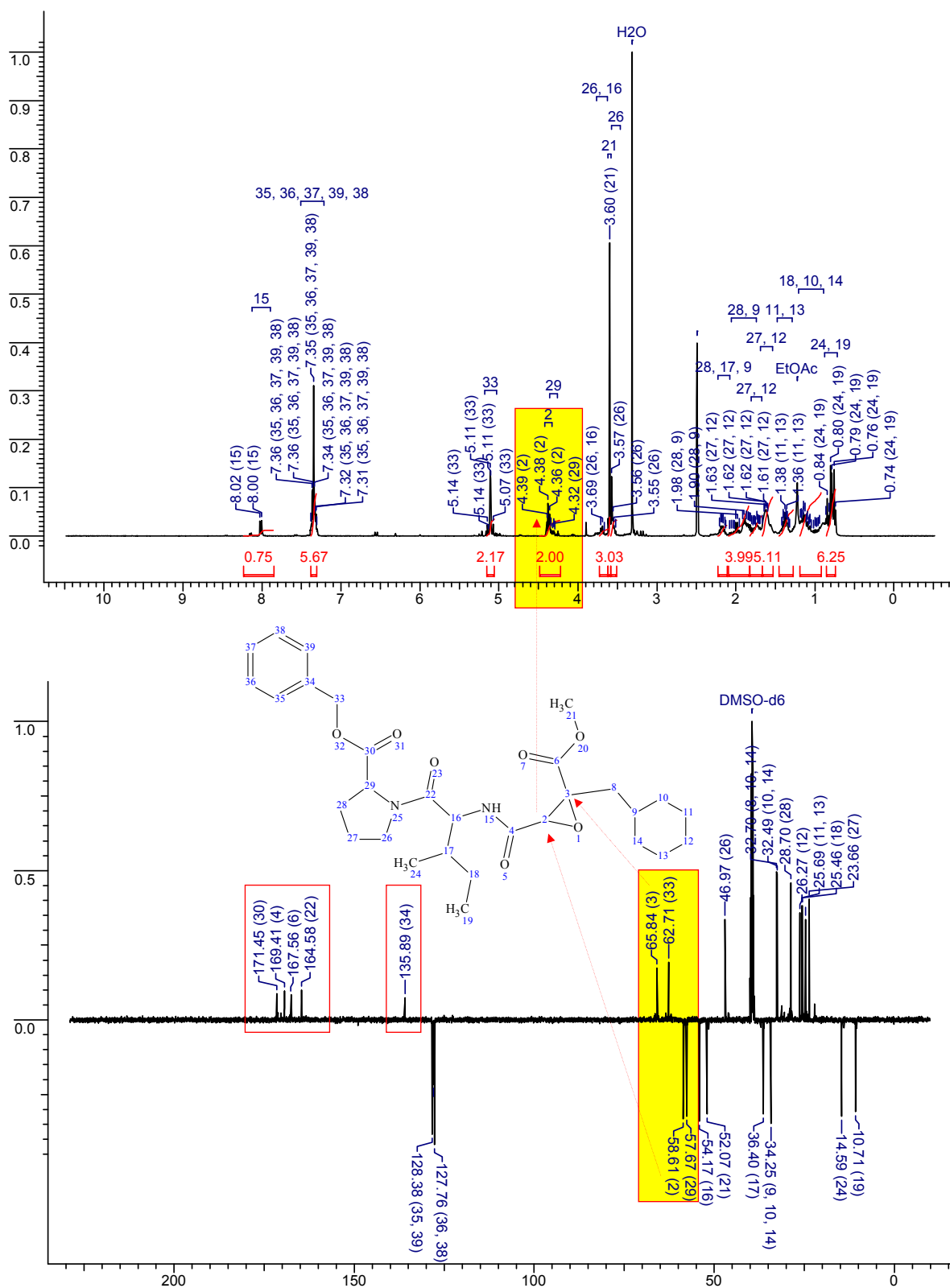


Abbildung 118: Ausschnitte aus dem ¹H- bzw. ¹³C-NMR-Spektrum von CA028-like-(rac)-Epoxy-(rac)-Cha-OMe (**605**) in DMSO-d₆ (DMSO Restsignal bei 49.5 ppm). Charakteristisch für das Epoxy-Peptid **605** ist das Protonensignal an C-2 (Stereozentrum) bei 4.38 ppm im ¹H-, sowie die Signale der Oxiran-Kohlenstoffatome C-2 und C-3 bei 58.6 ppm bzw. 65.8 ppm im ¹³C-NMR-Spektrum.

Die Synthese der *CA028-like-(rac)*-Epoxy-Asp-Verbindung **607** gestaltete sich wie auch die Darstellung des *E64c-like-(rac)*-Epoxy-Asp-Peptids **597** mitunter sehr schwierig, und führte zu einer vermehrten Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Eine Abtrennung der zahlreichen Nebenprodukte konnte zwar mittels aufwendiger säulenchromatographischer Reinigungen erreicht werden, jedoch spiegelt sich das in einer Ausbeute von nur 32% wider. Ein möglicher Grund für die schlechte Kupplungseffizienz des Epoxy-Asp-Derivats (**492**) mit Dipeptid (**326**) mag auf die zusätzliche Carbonylgruppe in der Seitenkette von **492** zurückgeführt werden, wobei während der Synthese der *E64c-* als auch *CA028-like-(E)*-Alken-Tripeptide kein negativer Einfluss auf die Kupplungseffizienz von **492** ausging. Die finale Verseifung der permanenten Schutzgruppen erfolgte wie auch schon für die *CA028-like*-Tripeptide mittels LiOH (0.5 M) in THF bei 0 °C innerhalb 2 h.^[iv] Nach abschließender Reinigung und Lyophilisation wurden die *CA028-like*-Epoxy-Tripeptide (**617-624**) in Ausbeuten von durchschnittlich 60% erhalten. Die biologischen Aktivitäten der *CA028-like*-Alken-, Diol- und Epoxy-Tripeptiden sollten sowohl für die Ester als auch ihrer korrespondierenden Säuren bestimmt werden.

4.3 Enzymkinetische Charakterisierung der *E64c-* und *CA028-like*-Inhibitorbibliothek

Die Mehrzahl der mit einer Veränderung der Cathepsinaktivität einhergehenden Erkrankungen zeichnen sich durch eine Überexpression einer oder mehrerer dieser Proteasen aus. Eine Reihe der Erkrankungen wie Osteoporose, Arthritis, Morbus, Alzheimer, Parkinson, Psoriasis sowie die Invasivität und Metastasierung von Tumoren werden hiermit in Verbindung gebracht. Zusätzlich spielen in vielen pathogenen Parasiten, wie z.B. Protozoen der Gattung *Plasmodium* und *Trypanosoma*, papainähnliche Cysteinproteasen eine bedeutsame Rolle bei Prozessen der Enzymaktivierung, der Hydrolyse von Wirtsproteinen, beim Wachstum und der Entwicklung des Parasiten sowie der Penetration in die Wirtszelle. Die Inhibierung der parasitären Cysteinproteasen stellt demnach eine potentielle Strategie zur Bekämpfung dieser Protozoen-Infektionen dar. 1879 wurde die erste Cysteinprotease aus der Papaya-Frucht, *Carica papaya* L. Caricaceae, gewonnen und charakterisiert und als Papain betitelt. Seither wurden unzählige weitere Cystein-Proteasen strukturell aufgeklärt und den papainähnlichen Proteasen („Clan CA“-Proteasen) zugeordnet und in Familien gegliedert. Wichtige parasitäre Proteasen werden der Familie C1 (Cathepsin B und Cathepsin L) und der Familie C2 (Calpain-ähnlich) zugeteilt. Die gezielte Inhibierung

^[iv] für Details siehe experimenteller Teil dieser Arbeit.

und Modulation dieser Proteasen bietet neue Chancen zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheitsbildern. Die Inhibition von Enzymen kann kovalenter und nicht-kovalenter Natur sein. Die reversible Enzyminhibition wiederum kann kompetitiv und nicht-kompetitiv erfolgen. Bei der kompetitiven Inhibition konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat um die Bindungsstelle. Nicht-kompetitive Inhibition bedeutet, dass der Inhibitor an einer anderen Stelle des Enzyms bindet und ein unproduktiver ternärer Komplex EIS (Enzym-Inhibitor-Substrat) gebildet wird. Eine zweite Möglichkeit der Enzyminhibition stellt die irreversible Inhibition dar. Hier bindet der Inhibitor in der aktiven Tasche und bildet dann eine kovalente Bindung mit dem Enzym aus E-I (Enzym-Inhibitor). Hierdurch wird die aktive Bindungstasche vollständig und irreversibel blockiert. Für die Konzeption cysteinproteasenspezifischer Inhibitoren, wurden die getesteten Tripeptide auf etablierten Leitstrukturen basierend entwickelt. Für das peptidische Motiv wurden zwei bekannte irreversible Cysteinprotease-Inhibitoren, CA-028 und E-64c gewählt. Zusätzlich wurde eine reaktive bzw. elektrophile Kopfgruppe („Warhead“) benötigt die mit einem Peptidmotiv verknüpft ist. Das Peptidmotiv dient als Erkennungssequenz, um die reaktive Kopfgruppe im katalytischen Zentrum des Enzyms zu lokalisieren. Als Positivkontrolle wurden die kommerziell erhältlichen irreversiblen Inhibitoren E-64, E-64c und CA074 verwendet. Die enzymkinetische Charakterisierung der Inhibitorbibliothek, sollte anhand der Hemmung vier papainähnlicher Cysteinproteasen, *Papain latex*, *Papain carica*, *Cathepsin B* sowie *Cathepsin L* erfolgen.

4.3.1 Screening der E64c- und CA028-like-Tripeptide gegen papain-ähnliche Cysteinproteasen

4.3.1.1 Prinzipieller Versuchsaufbau

Die enzymkinetischen Assays wurden analog zu den von A. Barrett *et al.* publizierten Assaybedingungen^[52,96,379] durchgeführt. Der detaillierte Versuchsaufbau ist dem experimentellen Teil zu entnehmen. Zur Ermittlung der besten Assaybedingungen wurden am Photometer Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Substrate und diversen Verdünnungen der Cysteinproteasen durchgeführt. Bei gleicher Enzymkonzentration wurden dafür jeweils drei Messungen bei 12 unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt und daraus die Mittelwerte der initialen Umsatzgeschwindigkeit über die ersten 10 Minuten ermittelt. Mittels der erhaltenen Werte für die Anfangsgeschwindigkeiten der einzelnen Substratkonzentrationen konnten die K_m -Werte als auch V_{max} und k_{cat} durch nichtlineare Regression mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit® bestimmt werden. In Abbildung 119 ist für Cathepsin B eine solche Zeitumsatzkurve dargestellt. Zur

Ermittlung der Aktivität der peptidischen Verbindungen an den Cysteinproteasen wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt.^[v] Bei Einhaltung der Temperaturkonstanz durch Temperatursensor und Kontrolleinheit wurde die lineare Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt der enzymatischen Hydrolyse des Substrates mit Hilfe eines Spektralphotometers bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ über 10 min detektiert. Die Endkonzentration des Substrats lag für CatB bei 1.0 mM, CatL 0.5 mM, *Papain carica* (0.6 mM) und *Papain latex* (0.6 mM) und die der Inhibitoren bei 30 μM .

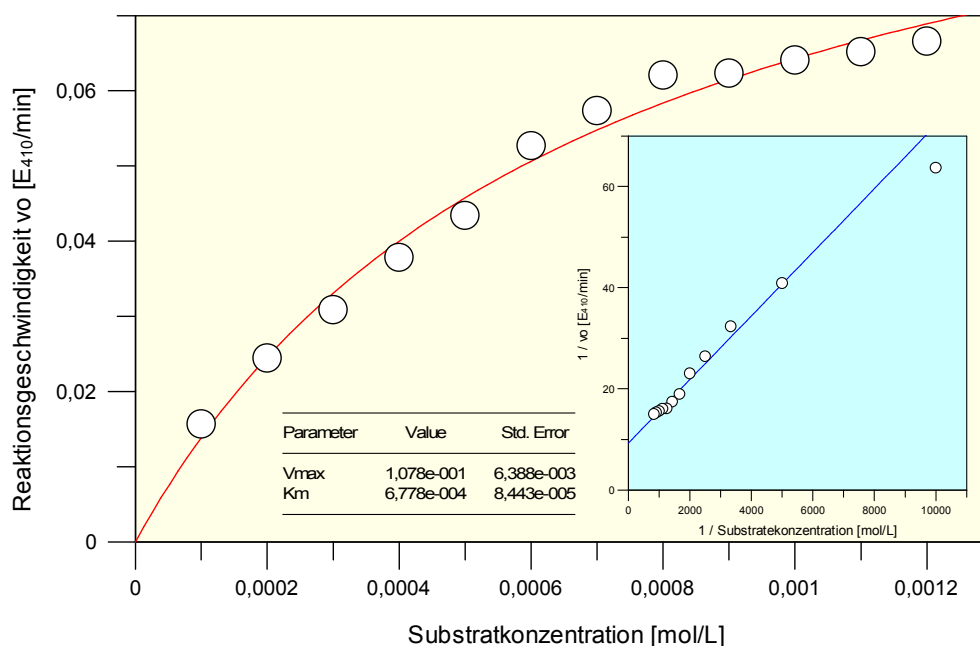


Abbildung 119: Zeigt die Zeitumsatzkurve von Cathepsin B (*Bovine Spleen*) für 12 unterschiedliche Substratkonzentration (Z-Arg-Arg-pNA) zur Ermittlung der günstigsten Assaybedingungen sowie der Berechnung des K_m -Werts und V_{\max} mittels Linearisierung nach Lineweaver-Burk.^[265,268]

Zuerst wurde die Enzymlösung (15 μL) mit Puffer (115 μL) versetzt und nach Zugabe der DMSO/Inhibitor-Lösungen (5 μL) für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe des entsprechenden Substrats (15 μL), wobei unter kontinuierlicher Aufnahme der Absorptionsänderung die enzymatische Hydrolyse verfolgt wurde. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Verbindung durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung <10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnte die prozentuale Hemmung der Verbindungen ermittelt werden. Um eine Denaturierung der Enzyme durch eventuell vorhandene Schwermetalle zu verhindern, enthalten die Puffer EDTA. Daneben dient ein niedermolekulares Thiol (DTT = Dithiothreitol) dazu, unerwünschte Disulfid-Brücken am Cystein-Rest im aktiven Zentrum zu reduzieren und damit die Cysteinproteasen zu

^[v] siehe experimenteller Teil dieser Arbeit.

aktivieren. Das nichtionische Tensid Brij 35 ist zur Verbesserung der Löslichkeit von Inhibitoren und Substrat zugesetzt und nur im Assay-, nicht jedoch im Enzym-Puffer enthalten. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 150 μL enthält Enzym, Puffer, Inhibitoren und Substrat. Zur Verbesserung der Löslichkeit ist DMSO zugesetzt, wobei die maximale DMSO-Konzentration (Substrat und Inhibitoren sind auch in DMSO gelöst) 10% betrug, um die Aktivität und Stabilität der Enzyme nicht zu beeinträchtigen. Neben den synthetischen *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptiden wurden die als Standard eingesetzten, irreversiblen, kommerziell erhältlichen Cysteinprotease-Inhibitoren E-64, E-64c und CA074 vermessen. Für eine weitere Überprüfung der beobachteten Hemmungen wurde das prinzipiell inaktive synthetische *CA028-like*-(Z)-Alken-Tripeptid noch als zusätzliche Kontrolle für eine unspezifische Hemmung vermessen. Zur Kontrolle wurde jeweils zu Beginn und Ende der Messungen ein Ansatz ohne Inhibitor vermessen, um zu überprüfen, ob die Enzymaktivität am Ende der Messreihe noch erhalten war. Es wurden maximal 10% Aktivitätsunterschied toleriert. Die bei den Assays verwendeten Substrate, Puffer sowie die spezifischen Bedingungen der jeweiligen Enzyme sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

4.3.1.2 Screening von *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptiden gegen *Papain latex*

Zur Ermittlung der Hemmung wurde bei 25 °C ein kontinuierlicher Assays durchgeführt. Die Absorptionzunahme des Spaltprodukts (*p*-Nitroanilin) von Pyr-Phe-Leu-*p*NA wurde bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ über 10 min detektiert.^[52,96,379] Es erfolgte eine Vorinkubation von Enzym und Inhibitor für 10 min bei 25 °C. Die eingesetzte Inhibitorkonzentration betrug für alle Verbindungen während des Screenings 30 μM . In Tabelle 8 sind die spezifischen Assaybedingungen der verwendeten Enzyme, ihre Konzentrationen, die Substratkonzentrationen, sowie Puffer und K_m -Werte aufgelistet.

Tabelle 8: Assaybedingungen des Tripeptid-Screenings gegen *Papain latex*.

<i>Papain latex</i> – Kontinuierlicher Assay			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH_2PO_4 (200 mM), Na_2HPO_4 (200 mM), Na_2EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	115 μL
Enzym	<i>Papain latex</i> (21.11 U/mg)	0.2 μM	15 μL
Substrat	Pyr-Phe-Leu- <i>p</i> NA, $K_m(\text{PL})$: 0.42 mM	0.6 mM	15 μL
Temperatur	30 °C		
Detektion	$\lambda = 410 \text{ nm}$, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Inhibitoren	<i>E64c</i> - bzw. <i>CA028-like</i> - Alken-, -Diol-, -Epoxy-Tripeptide	30 μM	5 μL
Volumina	115 μL [P], 15 μL [E], 15 μL [S], 5 μL [I]		

[P] = Puffer, [E] = Enzym, [S] = Substrat, [I] = Inhibitor

Bei Betrachtung der prozentualen Hemmung^[265] von *Papain latex*, durch die *E64c-like-(E)*-Alken-Tripeptide (Abbildung 120) fällt auf, dass sowohl die geschützten aliphatischen *E64c-like-Alken-Ala-OtBu* (**528**) bzw. –Leu-OtBu (**529**) als auch die mit freier Carboxyfunktion –Ala-OH (**535**) bzw. –Leu-OH (**536**) nur eine geringfügige Hemmung (<20%) der Protease aufweisen. Die geschützten aromatischen *E64c-like-(E)*-Alkene-Derivate –Phg-OtBu (**530**) und –Phe-OtBu (**531**) als auch die entsprechenden entschützten –Phg-OH (**537**) bzw. –Phe-OH (**538**) Verbindungen sind deutlich aktiver (Hemmung >45%) als die aliphatischen Derivate (**528**, **529**, **535**, **536**), wobei sowohl für die aromatischen als auch aliphatischen *E64c-like-(E)*-Alkene die Hemmstärke mit freier Carboxyfunktion deutlich abnimmt.

4.3.1.2.1 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like-(E)*-Alken-Tripeptide gegen *Papain latex*

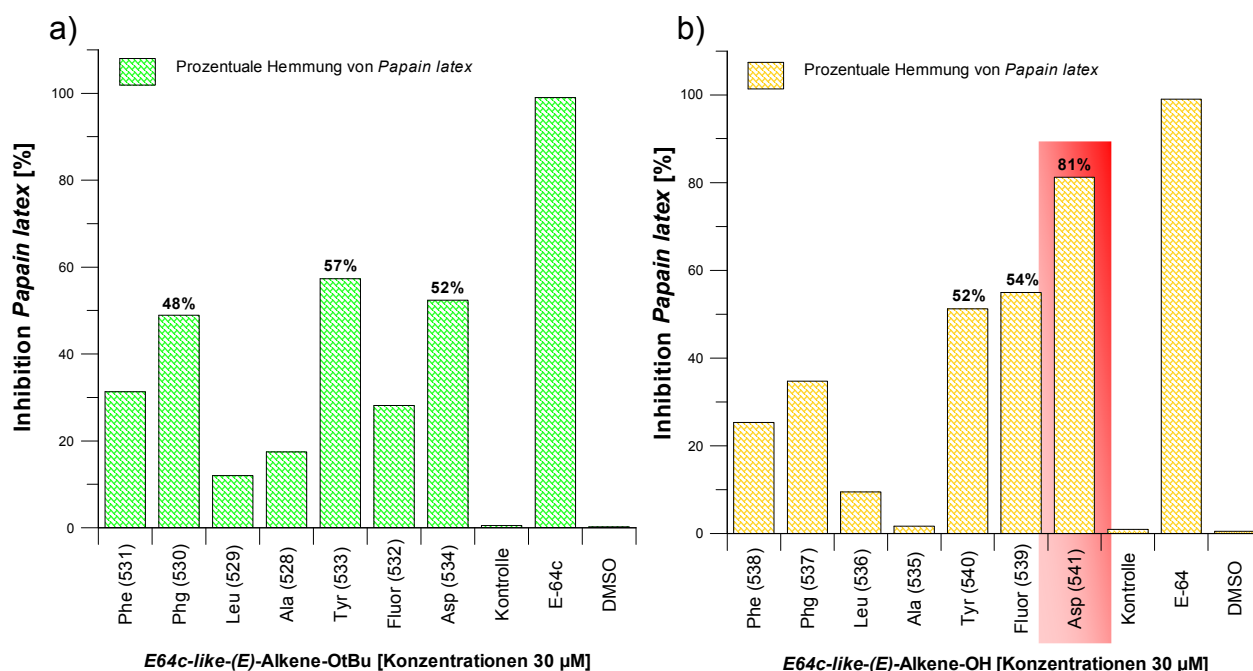


Abbildung 120: Prozentuale Hemmung von *Papain latex* durch die getesteten *E64c-like-(E)*-Alkene (**528-541**) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *E64c-like-(E)*-Alkene-OtBu (**528-534**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c-like-(E)*-Alkene-OH (**535-541**). Die aktivste Verbindung, *E64c-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**541**) ist rot hinterlegt.

Die Hemmstärken von *E64c-like-Alken-Fluor-Ala-OtBu* (**532**) bzw. –Fluor-Ala-OH (**539**) unterscheiden sich erheblich, so dass das Derivat mit freier Carboxyfunktion **539** (p.H. 54%) *Papain latex* doppelt so stark hemmt als die korrespondierende, geschützte Verbindung **532** (p.H. 26%). Auf die Hemmstärke der *E64c-like-(E)*-Alken-Tyr-Verbindungen, geschützt –Tyr-OtBu (**533**) bzw. mit freier Carboxyfunktion –Tyr-OH (**540**) scheint die Carboxygruppe nur einen geringfügigen bis keinen Einfluss zu haben, wohingegen das *E64c-like-(E)*-Alken-Asp-

OtBu (**534**) eine deutlich schwächere Hemmung (52%) aufweist als das entschützte -Asp-OH-Derivat (**541**, 81%). Mit einer prozentualen Hemmung von 81% wies Asp-OH (**541**) die stärkste Aktivität innerhalb der Gruppe der *E64c-like-(E)*-Alkene gegen *Papain latex* auf. Eine signifikante Hemmung der Protease wurde auch durch die *E64c-like-(E)*-Alkene; Phg-OtBu (**530**; 48%), Tyr-OtBu (**533**; 57%) und Fluor-Ala-OH (**539**; 54%) beobachtet. Für weiterführende Bestimmungen der Hemmkonstanten und IC_{50} -Werte wurde aus jeder Tripeptid-Gruppe z.B. *E64c-like*-Alkene oder *CA028-like*-Alkene usw. jeweils die aktivste Verbindung ausgewählt, so dass für die *E64c-like*-Alkene das Asp-OH-Derivat (**541**) näher untersucht wurde.

Die *CA028-like-(E)*-Alken-Tripeptide hemmen *Papain latex* deutlich stärker (Abbildung 121) als die oben besprochenen *E64c-like*-Alken-Derivate, wobei hier hinsichtlich des Substituenten eine entgegengesetzte Inhibitionstendenz vorliegt. So sind die aromatischen *CA028-like*-Alkene -Phg-OMe (**546**), Phe-OMe (**547**) als auch das aliphatische Derivat Leu-OMe (**544**) mit einer durchschnittlichen prozentualen Hemmung von >65% deutlich aktiver als die aromatischen bzw. aliphatischen *E64c-like*-Alkene (s. Abbildung 120).

4.3.1.2.2 Prozentuale Hemmwerte: *CA028-like-(E)*-Alken-Tripeptide gegen *Papain latex*

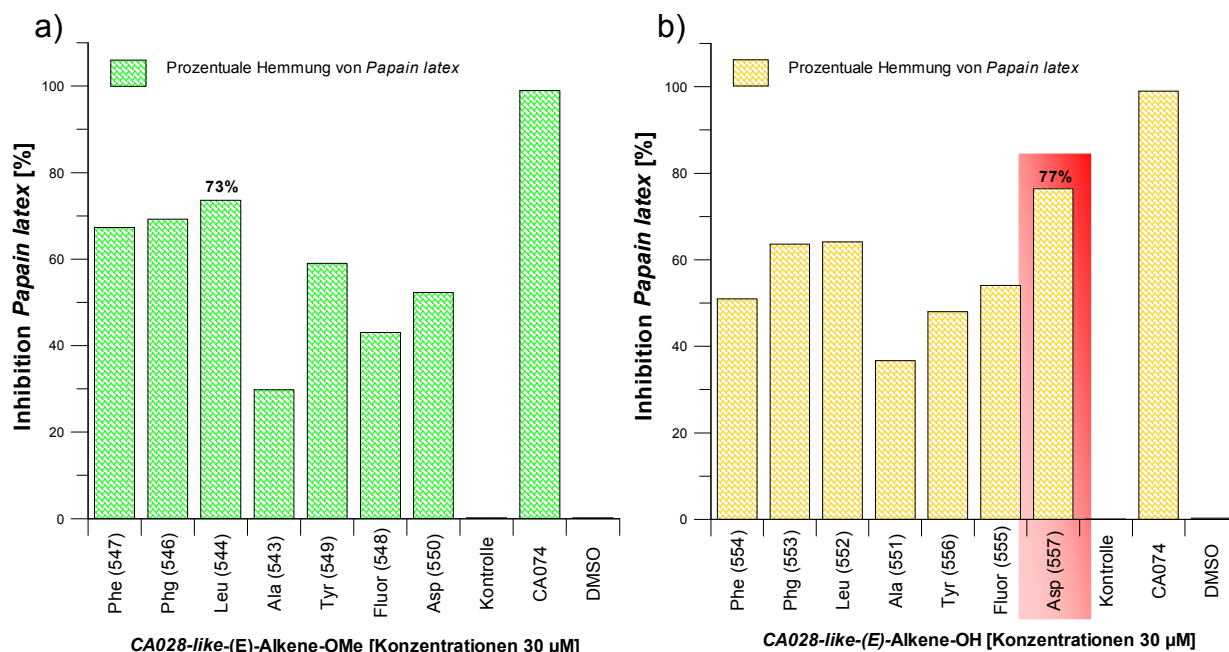


Abbildung 121: Prozentuale Hemmung von *Papain latex* durch die getesteten *CA028-like-(E)*-Alkene (**543-557**) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *CA028-like-(E)*-Alkene-OMe (**543-550**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *CA028-like-(E)*-Alkene-OH (**551-557**). Die aktivste Verbindung, *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**557**) ist rot hinterlegt.

Für einige der *CA028-like*-Alkene (**554**, **552**, **566**), führte eine freie Carboxyfunktion zu einem Abfall der Hemmstärke von durchschnittlich 20%, wohingegen eine freie Carboxyfunktion für das Asp-OH-Derivat (**557**) zu einer Zunahme der Hemmung um >20% führte. Generell konnte man bei den *CA028-like*-Alkene (s. Abbildung 121) eine geringere Abhängigkeit der prozentualen Hemmung von dem entsprechenden Substitutionsmuster beobachten als bei den *E64c-like*-Alkenen (s. Abbildung 120). Interessanterweise wurde *Papain latex* von den beiden Asp-Derivate der Peptidmotive *E64c-like*- (**541**) bzw. *CA028-like*- (**557**) mit 81% und 77%, entsprechend am stärksten gehemmt, wobei eine inverse Orientierung der beiden Tripeptide **541** bzw. **557** im Bindungsspalt angenommen wird, und damit ein direkter Zusammenhang zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen wurde. Für eine genauere Charakterisierung der Hemmung von *Papain latex* durch die Aspartat-Derivate (**541**) bzw. (**557**) wurden die IC₅₀-Werte als auch die Hemmkonstanten, K_i, k_i und k_{2nd} bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.1).

Die signifikanten Hemmwerte der getesteten *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Diole waren eine große Überraschung, da bisher keine veröffentlichten Daten hinsichtlich einer Inhibition von papainähnlichen Cysteinproteasen mittels eines peptidischen Diols bekannt sind. Es wurden zwar unterschiedliche symmetrische Diole als reversible Inhibitoren der HIV-Protease (Aspartyl-Protease) beschrieben, jedoch existieren bisher keinerlei solcher Daten für die papainähnlichen Cysteinproteasen.

Papain latex wurde durch den Großteil der *E64c-like*-(S,S)- bzw. (R,R)-Diole (Abbildung 122), signifikant gehemmt (>60%), wobei das *E64c-like*-(S,S)-Diol-Ala-OtBu (**558**) bzw. Ala-OH (**566**) die schwächste Aktivität gegen *Papain latex* mit einer prozentualen Hemmung von durchschnittlich 20% aufwies. Die *E64c-like*-(S,S) bzw. (R,R)-Diole waren mit geschützter Carboxyfunktion generell stärker aktiv als die mit freier, was für einige *E64c-like*-Diole z.B. **570** und **572** sogar zu einem drastischen Aktivitätsabfall von bis zu 40% führte. Eine Präferenz hinsichtlich eines bestimmten Enantiomers (S,S)- bzw. (R,R)-Diol oder ein deutliches Favorisieren eines Substitutionsmusters konnte für die *E64c-like*-Diole an *Papain latex* nicht beobachtet werden. Anhand Abbildung 122 ist aber deutlich ersichtlich, dass sich eine freie Carboxyfunktion auf die Hemmstärke der *E64c-like*-(R,R)-Diole (**570-573**) deutlicher stärker negativ auswirkt als auf die der entsprechenden -(S,S)-Diole (**566-569**). Aufgrund der ähnlichen, aber signifikanten Hemmung von *Papain latex* durch die *E64c-like*-(S,S)-, bzw. -(R,R)-Diole war es schwer eine repräsentative Verbindung für die weitere Charakterisierung auszuwählen. Letztlich fiel die Entscheidung auf das *E64c-like*-(S,S)-Diol-Leu-OtBu (**559**) das aufgrund der größten prozentualen Hemmung (83%) gegen *Papain latex* für eine weitere Bestimmung der Hemmkonstanten (K_i, k_i und k_{2nd}) und IC₅₀-Werte ausgewählt wurde (s. Abschnitt 4.3.2.1).

4.3.1.2.3 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Diol-Tripeptide gegen *Papain latex*

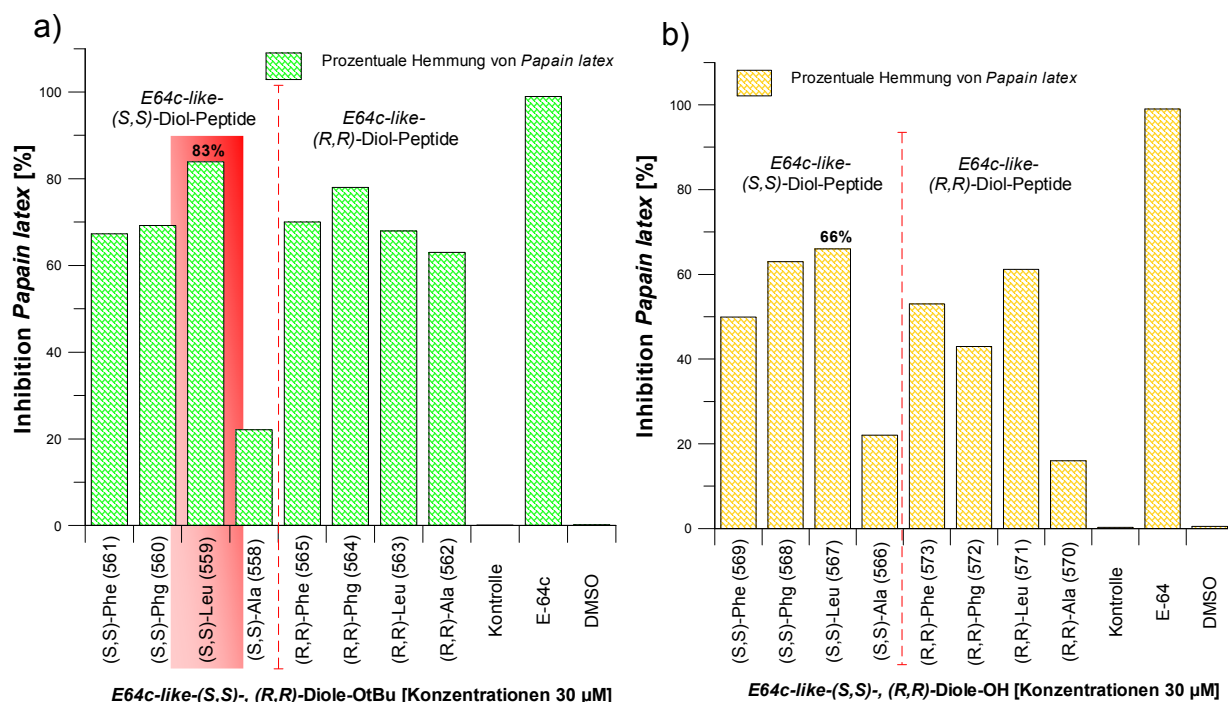


Abbildung 122: Prozentuale Hemmung von *Papain latex* durch die getesteten *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Diol-Tripeptide (558-573) bei einer Endkonzentration von 30 μ M; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Tripeptide (558-561) bzw. -(*R,R*)-Diol-Tripeptide (562-565); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Tripeptide (566-569) und -(*R,R*)-Diol-Tripeptide (570-573). Die aktivste Verbindung, *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Leu-OtBu (559) ist rot hinterlegt.

Im direkten Vergleich zu den *E64c-like*-Diol-Tripeptiden (s. Abbildung 122) wurde für die analogen *CA028-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Diol-Tripeptide im Durchschnitt eine deutlich schwächere prozentuale Hemmung (p.H. 40%) beobachtet. Im Fall der carboxyterminal-geschützten *CA028-like*-Diol-OMe-Tripeptide scheint keine bzw. nur eine geringfügige Präferenz hinsichtlich der (*R,R*)-konfigurierten *CA028-like*-Diol-Peptide (579-581) zu bestehen (s. Abbildung 123), wobei das *CA028-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OMe (576) mit einer p.H. von knapp 40% im Bereich der (*R,R*)-Diol-Peptide liegt und damit eine Ausnahme unter den (*S,S*)-Diol-Verbindungen (574-577) darstellt. Eine freie Carboxfunktion führt bei den *CA028-like*-(*S,S*)-Diol-OH-Tripeptiden nur zu einer mäßigen Steigerung der Aktivität, wohingegen für die meisten (*R,R*)-Diol-OH-Tripeptide (586, 588, 589) sogar ein leichter Aktivitätsabfall zu verzeichnen ist.

4.3.1.2.4 Prozentuale Hemmwerte: CA028-like-(S,S)- bzw. -(R,R)-Diol-Tripeptide gegen *Papain latex*

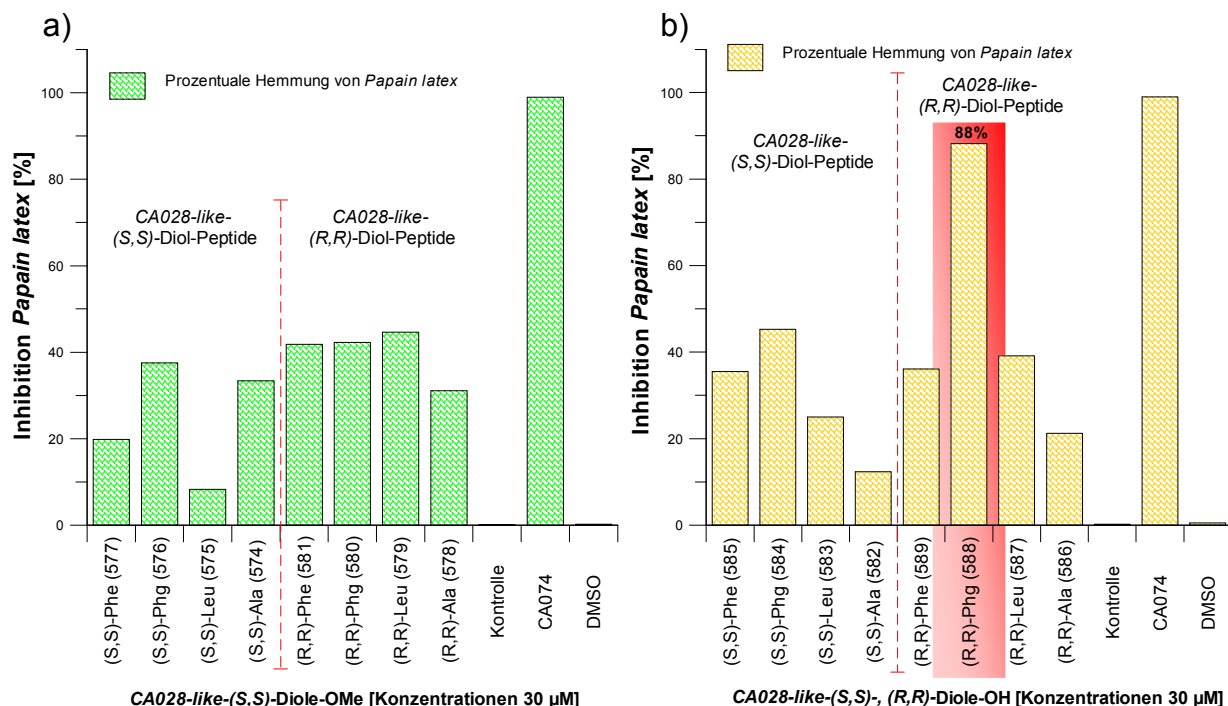


Abbildung 123: Prozentuale Hemmung von *Papain latex* durch die getesteten CA028-like-(S,S)- und (R,R)-Diolen (**574-589**) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten CA028-like-(S,S)-Diol-OMe (**574-577**) bzw. (R,R)-Diol-OMe (**578-581**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten (S,S)-Diol-OH (**582-585**) und (R,R)-Diol-OH (**586-589**). Die aktivste Verbindung, CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH (**588**) ist rot hinterlegt.

Daher ist die erstaunliche Hemmung (p.H. 88%) von *Papain latex* durch das entschützte CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH (**588**) umso überraschender, da es nicht wie für die restlichen entschützten CA028-like-(R,R)-Diolen zu einer Abnahme der Aktivität kam, sondern zu einer Verdopplung der prozentualen Hemmung. Die entsprechende enantiomere Verbindung CA028-like-(S,S)-Diol-Phg-OH (**584**) wies interessanterweise eine deutlich geringere prozentuale Hemmung (>50%) auf. Das CA028-like-(R,R)-Diol-OH (**588**) weist innerhalb CA028-like- und E64c-like-Diolen (s. Abbildung 122 und 123) die größte Aktivität gegen *Papain latex* auf, was möglicherweise in einem spezifischen Bindungsmodus begründet liegt, da für die restlichen CA028-like- bzw. E64c-like-Diolen außer für E64c-like-(S,S)-Diol-Leu-OtBu (**559**) keine derartig signifikante Hemmung beobachtet wurde. Für die weitere Charakterisierung hinsichtlich der Art und Stärke der Hemmung wurden für das CA028-like-(R,R)-Diol-Phenylglycin-OH (**588**) die IC₅₀-Werte sowie eine mögliche zeitabhängige bzw. zeitunabhängige Hemmung bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.1).

Bei den getesteten *E64c-like*-(*S,S*) bzw. -(*rac*)-Epoxy-Tripeptiden (s. Abbildung 124) zeichnet sich eine deutliche Bevorzugung hinsichtlich der carboxyterminal-geschützten und entschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phe- (**592**, **610**) und -(*rac*)-Epoxy-Cha-Verbindungen (**595**, **613**) ab. Eine freie Carboxyfunktion der beiden *E64c-like*-Epoxy-Peptide (**610** und **613**) führten zu einer beträchtlichen Aktivitätssteigerung, so dass für **610** bzw. **613** eine Hemmung von 99% und 79% (bei einer Endkonzentration von 30 μ M) ermittelt wurden. Für die meisten der *E64c-like*-Epoxy-Tripeptide konnte keine besondere Aktivität oder Selektivität bezüglich der unterschiedlichen Substitutionsmuster beobachtet werden (s. Abbildung 124). Tendenziell scheinen aber die *E64c-like*-Epoxy-Peptide mit sehr großen Substituenten wie das *E64c-like*-Epoxy-Trp (**598**, **616**) bzw. -Epoxy-Asp (**597**) *Papain latex* am schwächsten zu hemmen (<25%).

4.3.1.2.5 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. -(*rac*)-Epoxy-Tripeptide gegen *Papain latex*

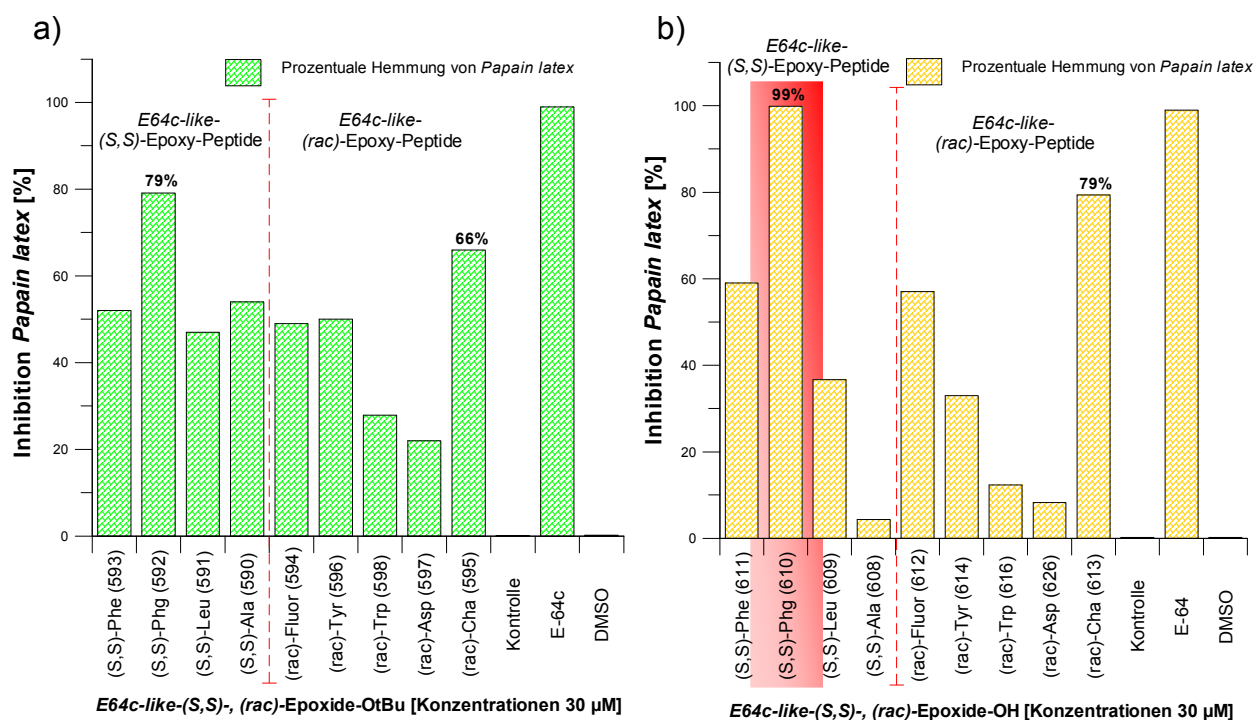


Abbildung 124: Prozentuale Hemmung von *Papain latex* durch die getesteten *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. (*rac*)-Epoxy-Tripeptide (**590-598**, **608-616**) bei einer Endkonzentration von 30 μ M; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-OtBu (**590-593**) bzw. -(*rac*)-Epoxy-OtBu-Peptide (**594-598**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-OH (**608-611**) bzw. -(*rac*)-Epoxy-OH-Peptide (**612-616**, **626**). Die aktivste Verbindung, *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phg-OH (**610**) ist rot hinterlegt.

Eine zusätzliche freie Carboxyfunktion der entschützten Epoxy-Asp-OH-Verbindung (**626**) führt zu einem starken Aktivitätsverlust (p.H. <10%), was möglicherweise auf die partiell negative Ladung der freien Carboxyfunktion zurückgeführt werden kann. Für eine weitere Charakterisierung der Hemmung wurden für das *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phg-OH (**610**) die Hemmkonstanten, IC_{50} -Werte bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.1).

4.3.1.2.6 Prozentuale Hemmwerte: *CA028-like*-(*R,R*)- bzw. -(*rac*)-Epoxy-Tripeptide gegen *Papain latex*

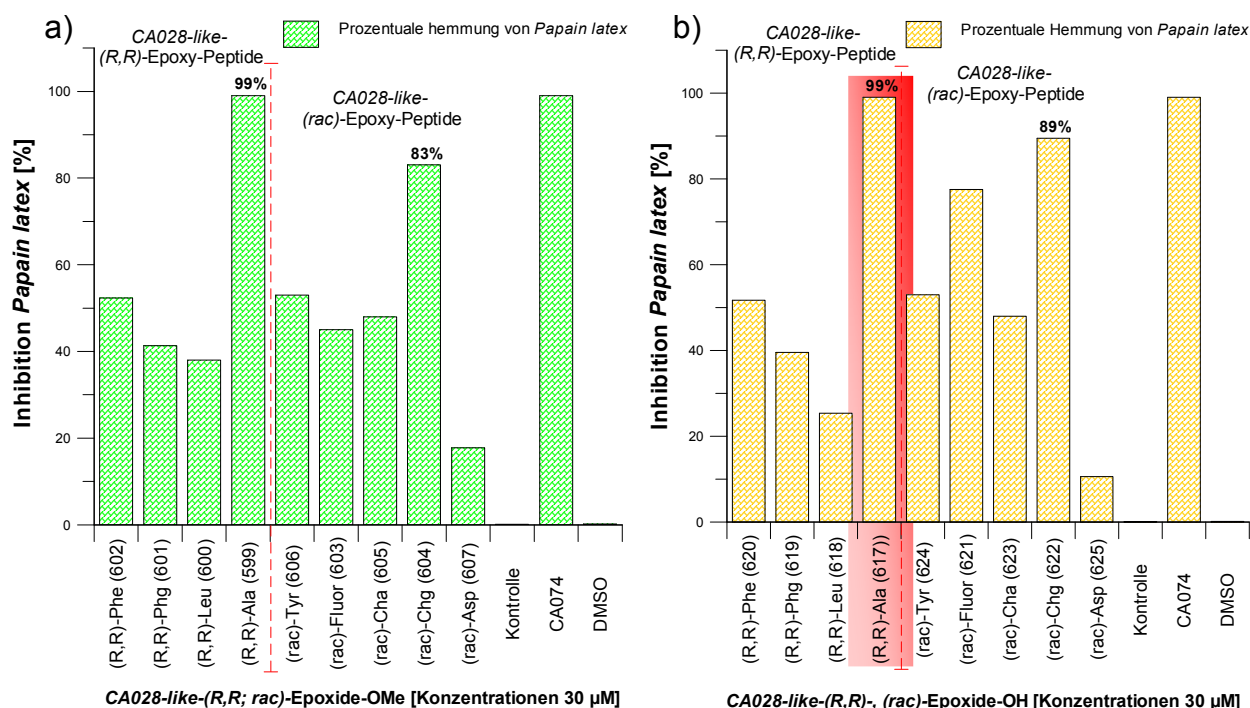


Abbildung 125: Prozentuale Hemmung von *Papain latex* durch die getesteten *CA028-like*-(*R,R*)- bzw. -(*rac*)-Epoxy-Tripeptide (**599-607**, **617-625**) bei einer Endkonzentration von 30 μ M; a) Hemmwerte der *carboxyterminal* geschützten *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxyde-OMe (**599-602**) bzw. -(*rac*)-Epoxyde-OMe (**603-607**); b) Hemmwerte der *carboxyterminal* entschützten *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxyde-OH (**617-620**) bzw. -(*rac*)-Epoxyde-OH (**621-625**). Die aktivste Verbindung, *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**) ist rot hinterlegt.

Für die *CA028-like*-(*R,R*)-Tripeptide wurde sowohl für das geschützte (*R,R*)-Epoxy-Ala-OMe (**599**) als auch das entschützte (*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**) eine bemerkenswerte Hemmung (p.H.>99%) gegen *Papain latex* nachgewiesen (Abbildung 125). Als zweitaktivste Verbindung innerhalb der Gruppe der *CA028-like*-Epoxy-Peptide konnte sich das geschützte -(*rac*)-Epoxy-Chg-OMe-Derivat (**604**) als auch das mit freier Carboxyfunktion -(*rac*)-Epoxy-Chg-OH-Derivat (**622**) mit einer prozentualen Hemmung von bis zu 89% platzieren. Die anderen *CA028-like*-(*R,R*)- bzw. -(*rac*)-Epoxy-Peptide verhielten sich dagegen eher unauffällig, und es

sind keine deutlichen Unterschiede bezüglich ihrer Aktivität und dem dazugehörigen Substitutionsmuster erkennbar. Auffällig war jedoch die enorme Aktivitätssteigerung des carboxyterminal entschützten *CA028-like-(rac)*-Epoxy-Fluor-Ala-OH-Peptids (**621**), dass in geschützter Form Fluor-Ala-OMe (**603**) mit einer p.H. von <45% *Papain latex* deutlich schwächer hemmt als das entsprechende ungeschützte Fluor-Ala-OH (**621**) mit einer p.H. von knapp 80%.

Zusammenfassend wird bei Betrachtung der aktivsten Verbindungen deutlich, dass sowohl für die *E64c-like*- als auch *CA028-like-(E)*-Alken-Tripeptide die Aspartat-Derivate, *E64c-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**541**) bzw. *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**557**) die stärksten Aktivitäten aufweisen. Bei den entsprechenden *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Diol-Peptiden können hinsichtlich einer spezifischen Präferenz eines Substitutionsmusters keine Aussagen gemacht werden, jedoch ist offensichtlich, dass die aktivste *E64c-like*-Diol-Verbindung eine (S,S)- und das aktivsten *CA028-like*-Diol-Derivat hingegen eine inverse (R,R)-Konfiguration aufweisen. Beim Vergleich der *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Epoxy-Peptide, *E64c-like*-(S,S)-Epoxy-Phg-OH (**610**) bzw. *CA028-like*-(R,R)-Epoxy-Ala-OH (**617**) handelt es sich um strukturell grundsätzlich unterschiedliche Substituenten, zum einen das Phenyl-substituierte *E64c-like*-Epoxy-Peptid (**610**) und zum anderen das Methyl-substituierte *CA028-like*-Derivat (**617**). Über die möglichen Ursachen kann derzeit nur spekuliert werden, genauere Aussagen lassen sich möglicherweise über die anschließende Charakterisierung durch Bestimmung der Hemmkonstanten für die in Abbildung 114 dargestellten Verbindungen machen.

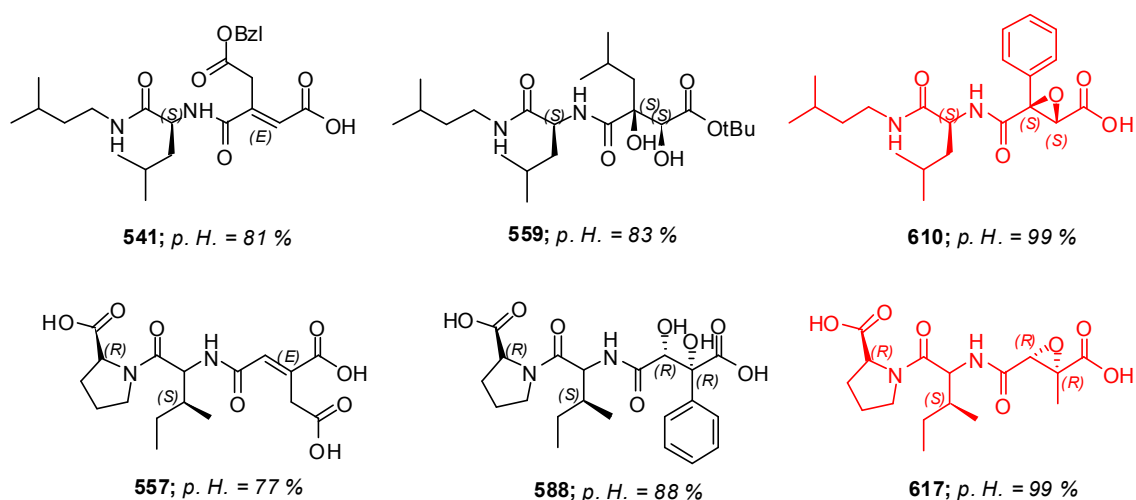


Abbildung 126: Die aufgeführten *E64c-like*- bzw. *CA028-like-(E)*-Alken-, Diol- und Epoxy-Tripeptide wurden mittels Bestimmung der IC_{50} -Werte und Hemmkonstanten (K_i , k_i , k_{2nd}) näher charakterisiert. Die Verbindungen mit den größten Hemmwerten (p.H.%) sind in rot dargestellt.

4.3.1.3 Screening von *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptiden gegen *Papain carica*

Zur Ermittlung der Hemmung wurde bei 25 °C ein kontinuierlicher Assays durchgeführt. Die Absorptionszunahme des Spaltprodukts (*p*-Nitroanilin) von Pyr-Phe-Leu-*p*NA wurde bei $\lambda = 410$ nm über 10 min detektiert.^[52,96,379] Es erfolgte eine Vorinkubation von Enzym und Inhibitoren für 10 min bei 25 °C. Die eingesetzte Inhibitor-Endkonzentration betrug für alle Verbindungen während des Screenings 30 μ M. In Tabelle 9 sind die spezifischen Assaybedingungen für, das Enzym, die Konzentrationen, die Substratkonzentrationen, sowie Puffer und K_m -Werte aufgelistet.

Tabelle 9: Assaybedingungen des Tripeptid-Screenings gegen *Papain carica*.

<i>Papain carica</i> – Kontinuierlicher Assay			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	115 μ L
Enzym	<i>Papain carica</i> (3.11 U/mg)	1.0 μ M	15 μ L
Substrat	Pyr-Phe-Leu- <i>p</i> NA, K_m (PC): 0.38 mM	0.6 mM	15 μ L
Temperatur	30 °C		
Detektion	$\lambda = 410$ nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Inhibitoren	<i>E64c</i> - bzw. <i>CA028-like</i> - Alken-, -Diol, -Epoxy-Tripeptide	30 μ M	5 μ L
Volumina	115 μ L [P], 15 μ L [E], 15 μ L [S], 5 μ L [I]		

[P] = Puffer, [E] = Enzym, [S] = Substrat, [I] = Inhibitor

Das zusätzliche Screening der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide an *Papain carica* diente unter anderem der Kontrolle und Überwachung der Reproduzierbarkeit der zuvor an *Papain latex* bestimmten Hemmwerte. Die erhalten prozentualen Hemmwerte für *Papain carica* spiegeln zwar nicht exakt eine Blaupause der für *Papain latex* erhaltenen Ergebnisse wieder, weisen aber bei direktem Vergleich der Balkendiagramme (s. Abbildung 127) ein ähnliches Aktivitätsverhältnis für die einzelnen Verbindungen auf. Innerhalb der getesteten *E64c-like*-(*E*)-Alken-Tripeptide wies wie auch schon zuvor an *Papain latex* das *E64c-like*-Alken-Asp-OH (**541**) mit freier Carboxyfunktion die größte prozentuale Hemmung (p.H. 74%) von *Papain carica* auf. Die anderen *E64c-like*-(*E*)-Alken-Peptide verhielten sich eher unspektakulär (Abbildung 127), nur für die beiden carboxyterminal geschützten *E64c-like*-Akene-, -Phg-OtBu (**530**) bzw. -Asp-OtBu (**534**) wurden noch akzeptable Hemmwerte von durchschnittlich 50% erzielt. Prinzipiell führte eine freie Carboxyfunktion der *E64c-like*-Alkene zu einer Abnahme der Aktivität, außer, dass für das schon erwähnte *E64c-like*-Alken-Asp-OH (**541**), dessen Hemmstärke sich aufgrund der freien Carboxyfunktion erheblich steigerte. Für eine weitere Charakterisierung wurden die Hemmkonstanten und IC₅₀-Werte für **541** bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.2).

4.3.1.3.1 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like-(E)*-Alken-Tripeptide gegen *Papain carica*

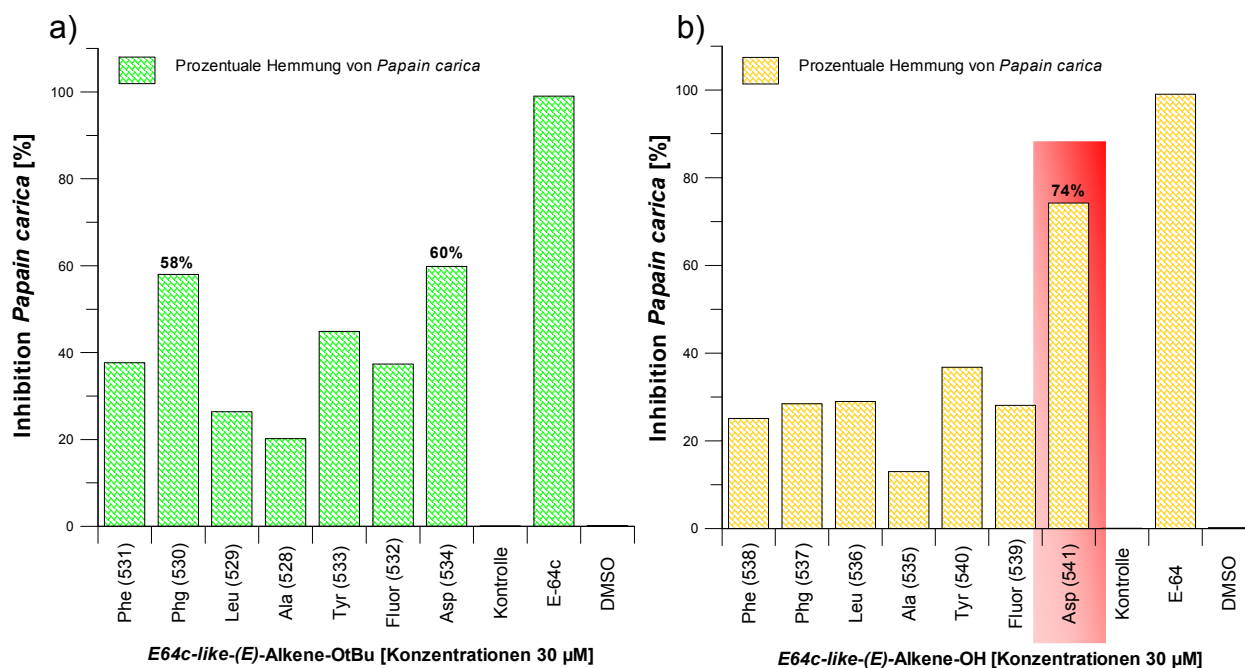


Abbildung 127: Prozentuale Hemmung von *Papain carica* durch die getesteten *E64c-like-(E)*-Alkene (**528-541**) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *E64c-like-(E)*-Alkene-OtBu (**528-534**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c-like-(E)*-Alkene-OH (**535-541**). Die aktivste Verbindung, *E64c-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**541**) ist rot hinterlegt.

Bei Betrachtung der prozentualen Hemmwerte der *CA028-like-(E)*-Alken-Tripeptide (Abbildung 128) fällt auf, dass sich ein ähnliches Inhibitionsmuster wie zuvor an *Papain latex* (s. Abbildung 121) abzeichnet. Interessanterweise bestand für den Inhibitionsassay gegen *Papain carica* eine größer Abhängigkeit der prozentualen Hemmung hinsichtlich des Vorhandenseins einer freien bzw. geschützten Carboxyfunktion der *CA028-like*-Alken-Peptide als noch zuvor an *Papain latex*. Für die meisten *CA028-like-(E)*-Alkene wurde keine bzw. nur eine geringe Abnahme der Aktivität in Verbindung mit einer freien Carboxyfunktion gefunden (Abbildung 128b). Die einzige Verbindung für die eine entgegengesetzte bzw. eine Zunahme der Aktivität beobachtet wurde ist das *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**557**), dass gleichzeitig auch mit einer p.H. von 74% das aktivste *CA028-like-(E)*-Alken gegen *Papain carica* darstellt. Neben der aktivsten Verbindung **557** (p.H. 74%) wiesen aber auch noch zwei weitere *CA028-like-(E)*-Alkene, -Phg-OMe (**546**) und Asp-OMe (**534**) eine vergleichbare bzw. signifikante Hemmung von 69% (**546**) und 65% (**534**) auf (Abbildung 128a). Für eine genauere Charakterisierung der Hemmung von *Papain carica* durch das *CA028-like-(E)*-Asp-OH (**541**) wurden die IC_{50} -Werte als auch die Hemmkonstanten, K_i , k_i und k_{2nd} bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.2).

4.3.1.3.2 Prozentuale Hemmwerte: CA028-like-(E)-Alken-Tripeptide gegen *Papain carica*

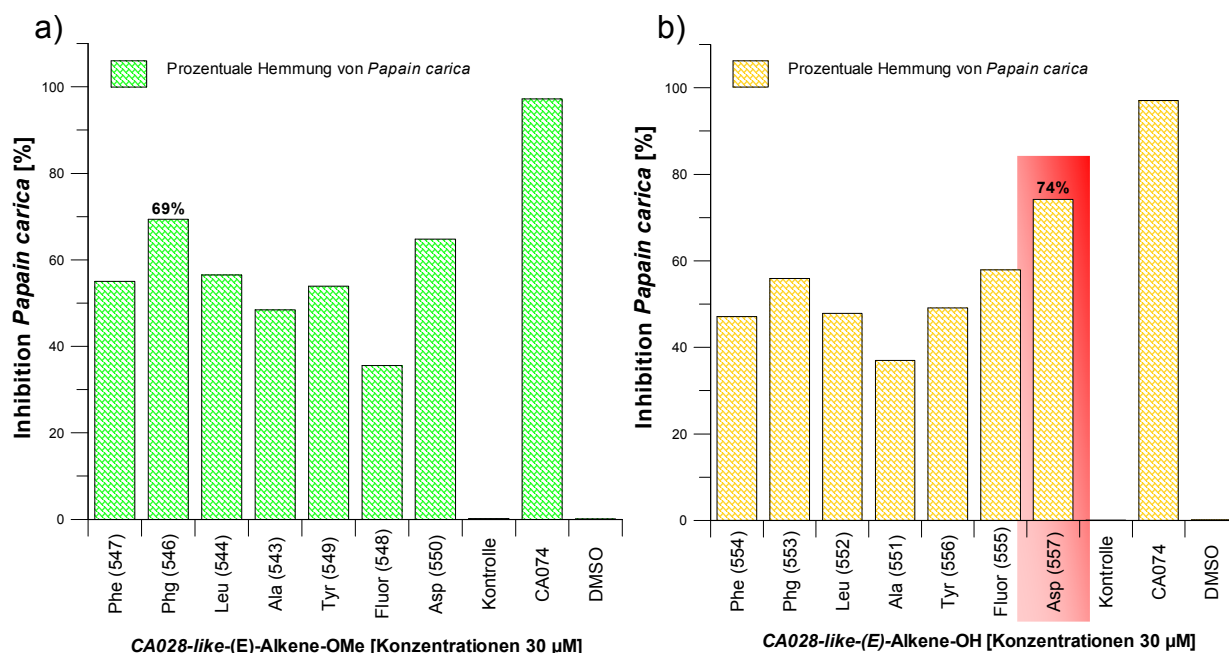


Abbildung 128: Prozentuale Hemmung von *Papain carica* durch die getesteten CA028-like-(E)-Alkene (543-557) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten CA028-like-(E)-Alkene-OMe (543-550); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten CA028-like-(E)-Alkene-OH (551-557). Die aktivste Verbindung, CA028-like-(E)-Alken-Asp-OH (557) ist rot hinterlegt.

Die erhaltenen Hemmdaten der E64c- und CA028-like-(S,S)- bzw. (R,R)-Diol-Peptide für *Papain latex* waren bezüglich des Screenings an *Papain carica* fast identisch. Wie anhand Abbildung 129 zu entnehmen ist, war das aktivste E64c-like-Diol wie auch schon gegen *Papain latex* das carboxyterminal entschützte E64c-like-(S,S)-Diol-Leucin-OH (567) mit einer prozentualen Hemmung von 84%. Eine freie (-OH) bzw. geschützte Carboxyfunktion (-OtBu) der E64c-like-Diole hatte auf die Hemmung von *Papain carica* (Abbildung 129) kaum einen Einfluss, wohingegen für *Papain latex* eine größere Abhängigkeit beobachtet wurde (Abbildung 122). In Bezug auf die Konfiguration der E64c-like-Diole, (S,S)- bzw. (R,R)- wurde keine oder nur eine marginale Bevorzugung (>10%) des (S,S)-Diol-Enantiomers gefunden. Interessanterweise war das E64c-like-(R,R)-Diol-Leu-OH (571) mit inverser Konfiguration fast genauso aktiv wie die aktivste Verbindung –(S,S)-Diol-Leu-OH (567), so dass ein direkter Einfluss der Stereoinformation der E64c-like-Diole auf die Hemmstärke gegen *Papain carica* eher ausgeschlossen wurde. Für die anschließende kinetische Charakterisierung wurden die IC₅₀-Werte für das E64c-like-(S,S)-Diol-Leu-OH (567) bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.2).

4.3.1.3.3 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like*-(S,S)- bzw. -(R,R)-Diol-Tripeptide gegen *Papain carica*

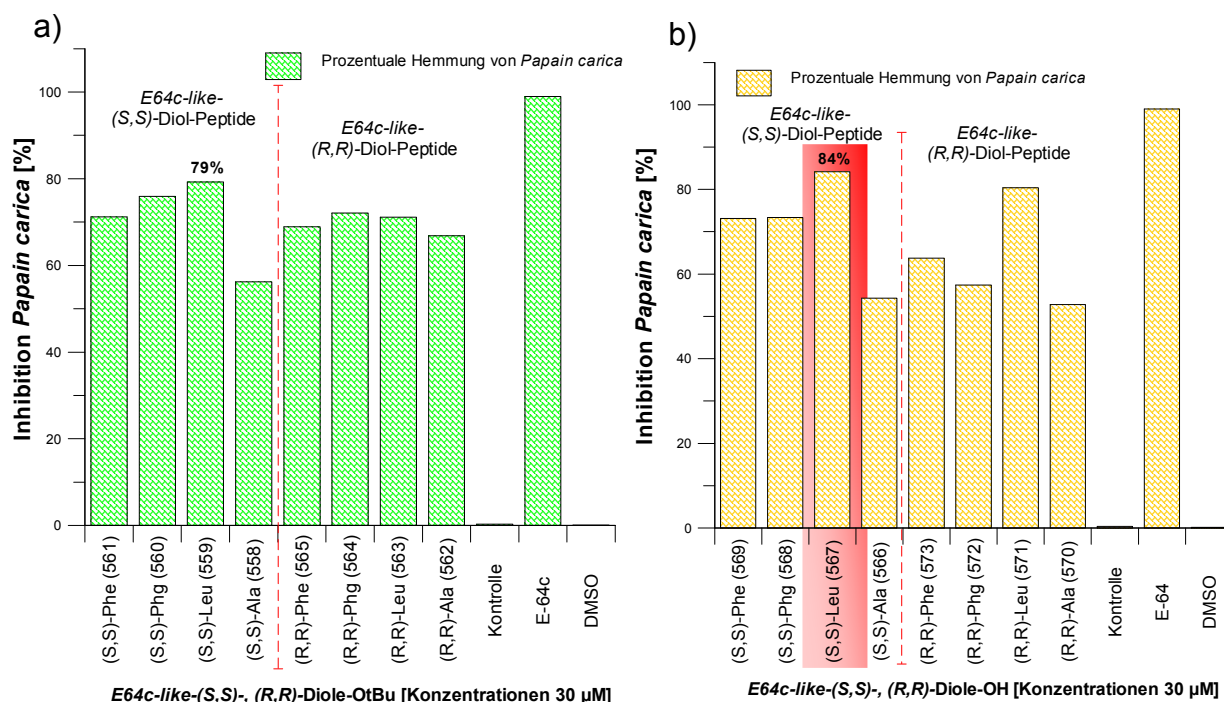


Abbildung 129: Prozentuale Hemmung von *Papain carica* durch die getesteten *E64c-like*-(S,S)- bzw. -(R,R)-Diole (558-573) bei einer Endkonzentration von 30 μM ; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *E64c-like*-(S,S)-Diole (558-561) bzw. -(R,R)-Diole (562-565); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c-like*-(S,S)-Diole (566-569) und -(R,R)-Diole (570-573). Die aktivste Verbindung, *E64c-like*-(S,S)-Diol-Leu-OtBu (559) ist rot hinterlegt.

Für die Hemmung von *Papain carica* durch die *CA028-like*-(S,S)- bzw. -(R,R)-Diol-Tripeptide (Abbildung 130) wurde ein fast identisches Hemmmuster wie schon zuvor für *Papain latex* (Abbildung 123) gefunden. Im direkten Vergleich zu den *E64c-like*-Diol-Tripeptiden (s. Abbildung 122) wurde für die analogen *CA028-like*-(S,S)- bzw. -(R,R)-Diol-Tripeptide durchschnittlich eine deutlich schwächere prozentuale Hemmung (p.H. <40%) beobachtet. Im Fall der carboxyterminal-geschützten *CA028-like*-Diol-OMe-Tripeptide scheint nur eine geringfügige Präferenz hinsichtlich der (R,R)-konfigurierten *CA028-like*-Diol-Peptide (579-581) zu bestehen (Abbildung 130), wobei das *CA028-like*-(S,S)-Diol-Phg-OMe (576) mit einer p.H. von knapp 40% im Bereich der (R,R)-Diol-Peptide liegt und damit eine Ausnahme unter den (S,S)-Diol-Verbindungen (574-577) darstellt. Eine freie Carboxfunktion führt bei den *CA028-like*-(S,S)-Diol-OH-Tripeptiden nur zu einer mäßigen Steigerung der Aktivität, wohingegen für die meisten (R,R)-Diol-OH-Tripeptide (586, 588, 589) ein leichter Aktivitätsabfall gefunden wurde.

4.3.1.3.4 Prozentuale Hemmwerte: CA028-like-(S,S)- bzw. -(R,R)-Diol-Tripeptide gegen *Papain carica*

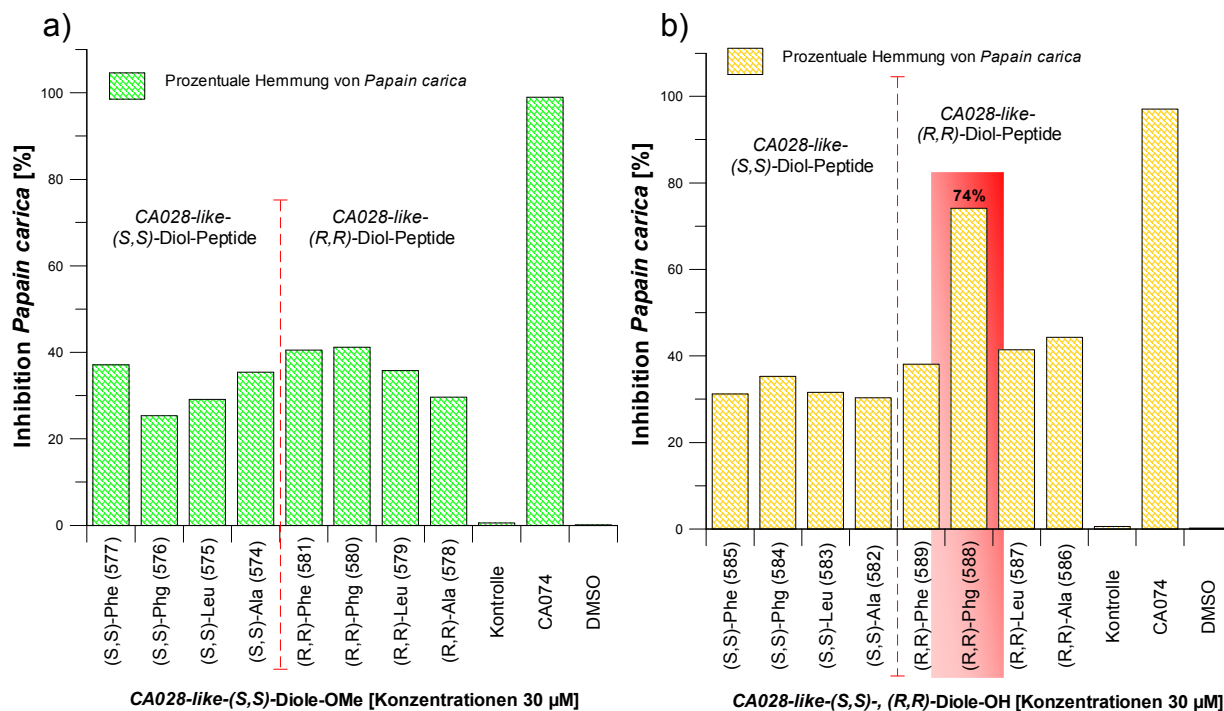


Abbildung 130: Prozentuale Hemmung von *Papain carica* durch die getesteten CA028-like-(S,S)- und (R,R)-Diols (**574-589**) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten CA028-like-(S,S)-Diol-OMe (**574-577**) bzw. (R,R)-Diol-OMe (**578-581**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten (S,S)-Diol-OH (**582-585**) und (R,R)-Diol-OH (**586-589**). Die aktivste Verbindung, CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH (**588**) ist rot hinterlegt.

Signifikant ist aber, dass sowohl gegen *Papain latex* als auch gegen *Papain carica* das carboxyterminal entschützte CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH (**588**) mit einer Hemmung von >70% die aktivste Verbindung ist, während es wie schon zuvor erwähnt für die anderen CA028-like-(R,R)- und (S,S)-Diol-Peptide (Abbildung 130b) zu einem Abfall der Aktivität kam führte die freie Carboxyfunktion von **588** zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung (ca. 100%). In geschützter Form konnte keine Bevorzugung hinsichtlich einer bestimmten Seitenkette bzw. Substituenten (Leu, Ala, Phg, Phe) in Verbindung mit den CA028-like-Diol-Peptiden gefunden werden. Ausschließlich in Verbindung mit einer freien Carboxyfunktion kam es zu der signifikanten Bevorzugung des Phenyl-substituierten CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH (**588**), wohingegen für die anderen CA028-like-(S,S)- und -(R,R)-Diol-Verbindungen nichts dergleichen beobachtet wurde. Für die weitere Charakterisierung der Hemmung von *Papain carica* durch CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH (**588**) wurden anschließend die IC₅₀-Werte bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.2).

4.3.1.3.5 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like*-(S,S)- bzw. -(rac)-Epoxy-Tripeptide gegen *Papain carica*

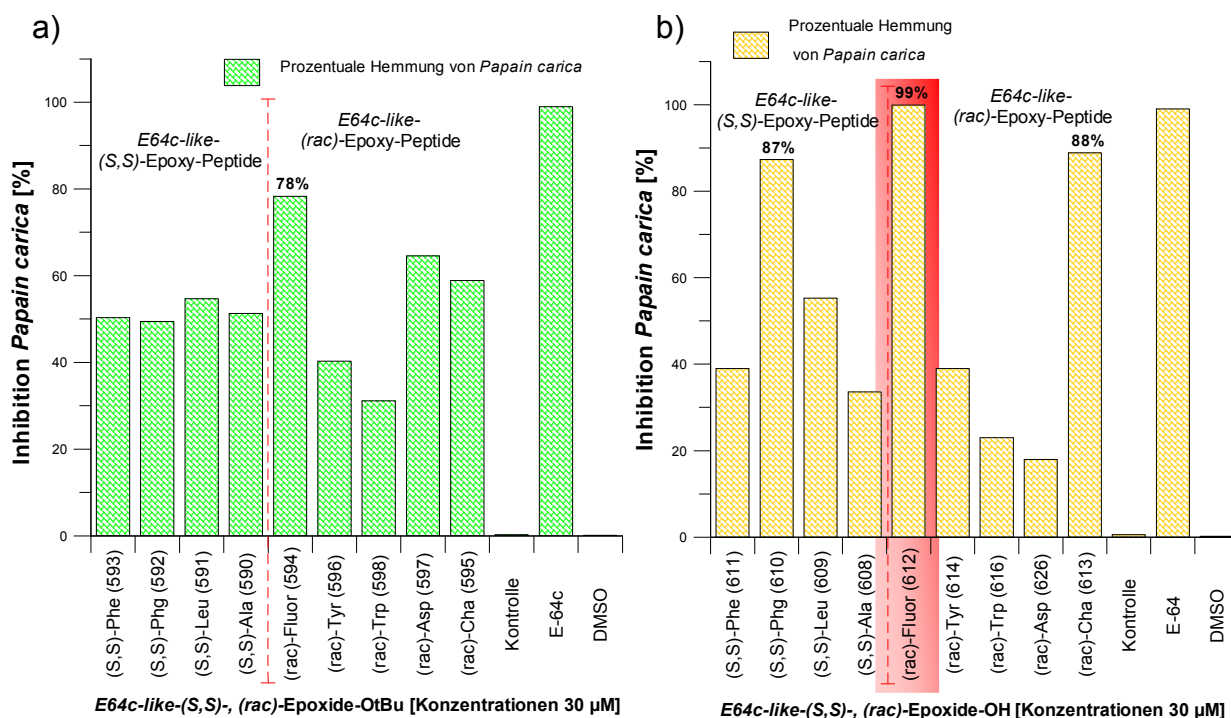


Abbildung 131: Prozentuale Hemmung von *Papain carica* durch die getesteten *E64c-like*-(S,S)- bzw. -(rac)-Epoxy-Tripeptide (**590-598**, **608-616**) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *E64c-like*-(S,S)-Epoxy-OtBu-Peptide (**590-593**) bzw. -(rac)-Epoxy-OtBu-Peptide (**594-598**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c-like*-(S,S)-Epoxy-OH-Peptide (**608-611**) bzw. -(rac)-Epoxy-OH-Peptide (**612-616**, **626**). *E64c-like*-(S,S)-Epoxy-β-Fluor-Ala-OH (**612**) ist rot hinterlegt.

Bei der Testierung der *E64c-like*-(S,S)- und -(rac)-Epoxy-Peptide gegen *Papain carica* kam es zu einem veränderten Hemmmuster (Abbildung 131) im Vergleich zu den für *Papain latex* erhalten Daten. Das enantiomerenreine *E64c-like*-(S,S)-Epoxy-Phg-OH (**610**) war gegen *Papain carica* zwar auch eine der aktivsten *E64c-like*-Epoxy-Peptide, jedoch nicht wie zuvor gegen *Papain latex* das aktivste Derivat. Für die Mehrzahl der carboxyterminal ge- bzw. entschützten *E64c-like*-Epoxy-Peptide konnten ähnliche Daten wie für *Papain latex* bestimmt werden. Für das *E64c-like*-(rac)-Epoxy-β-Fluor-Ala-OH (**612**) und -OtBu (**594**) verhielt es sich jedoch deutlich anders, sowohl für das carboxyterminal ge- (**594**) und entschützte (**612**) *E64c-like*-Epoxy-Peptid wurde im Vergleich zu den Daten für *Papain latex* eine enorme Zunahme der prozentualen Hemmung gegenüber *Papain carica* gefunden. Innerhalb der Gruppe der geschützten als auch entschützten *E64c-like*-Epoxy-Peptide (Abbildung 131) waren die fluorierten Derivate **594** (p.H. 78%) und **612** (p.H. 99%) die Aktivsten Verbindungen. Die *E64c-like*-Epoxy-Peptide, -(rac)-Epoxy-Cha-OH (**613**) und -(S,S)-Epoxy-

Phg-OH (**610**) waren wie auch für *Papain latex* bestimmt, sehr aktive Inhibitoren hinsichtlich *Papain carica*. Eine freie Carboxyfunktion führte für die *E64c-like*-Epoxy-Peptide, -(S,S)-Epoxy-Phg-OH (**610**), -(rac)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**) und -(rac)-Epoxy-Cha-OH (**613**) nochmals zu einer signifikanten Verstärkung des inhibitorischen Potential (s. Abbildung 131b). Interessanterweise führte eine freie Carboxyfunktion für die anderen *E64c-like*-Epoxy-Peptide hauptsächlich zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität. Für *E64c-like*-(rac)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**) wurden zusätzlich die Hemmkonstanten und IC₅₀-Werte bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.2).

4.3.1.3.6 Prozentuale Hemmwerte: CA028-like-(R,R)- bzw. -(rac)-Epoxy-Tripeptide gegen *Papain carica*

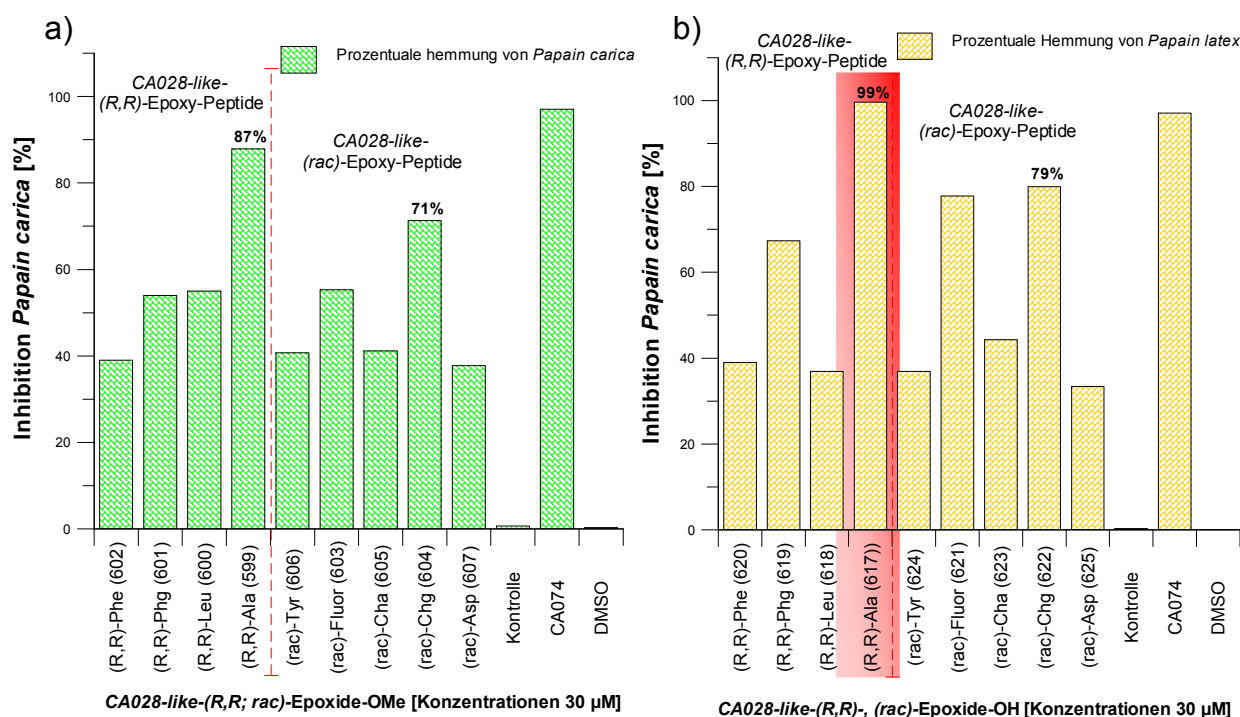


Abbildung 132: Prozentuale Hemmung von *Papain carica* durch die getesteten CA028-like-(R,R)- bzw. (rac)-Epoxy-Tripeptide (**599-607**, **617-625**) bei einer Endkonzentration von 30 μ M; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten CA028-like-(R,R)-Epoxy-OMe- (**599-602**) bzw. (rac)-Epoxy-OMe-Peptide (**603-607**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten CA028-like-(R,R)-Epoxy-OH- (**617-620**) bzw. -(rac)-Epoxy-OH-Peptide (**621-625**). CA028-like-(R,R)-Epoxy-Ala-OH (**617**) ist rot hinterlegt.

Analog dem *Latex*-Assay, wurde sowohl für die carboxyterminal geschützten- (OMe) als auch entschützten- (OH) CA028-like-(R,R)-Epoxy-Ala-Peptide (**599**, **617**), sowie (rac)-Epoxy-Chg-Peptide (**604**, **622**) eine bemerkenswerte Hemmung (<70%) gegen *Papain carica* ermittelt (Abbildung 132). Die fluoridierte Verbindung, CA028-like-(rac)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH

(**621**) hemmte (>75%) *Papain carica* signifikant, und bestätigte dadurch die Hemmdaten des *Papain latex*-Assays. Damit ist **621** die drittaktivste CA028-like-Epoxy-Verbindung, wohingegen der geschützte Vorläufer, CA028-like-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OMe (**603**) eine deutlich geringere Inhibition (p.H. 58%) aufwies. Für die Mehrzahl der CA028-like-Epoxy-Peptide wurde keine eindeutige Abhängigkeit der prozentualen Hemmwerte hinsichtlich einer freien (OH) oder geschützten (OMe) Carboxyfunktion gefunden. Eine freie Carboxyfunktion führte ausschließlich für die CA028-like-Epoxy-Peptide: (*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**621**), (*rac*)-Epoxy-Chg-OH (**622**) und -(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**) zu einer signifikanten Steigerung der prozentualen Hemmwerte (Abbildung 132b). Eine deutliche Präferenz hinsichtlich der (*R,R*)-konfigurierten CA028-like-Epoxy-Peptide wurden nicht gefunden. Die anschließenden Bestimmungen der IC₅₀-Werte und Hemmkonstanten wurden für CA028-like-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**) durchgeführt (s. Abschnitt 4.3.2.2). Bei Betrachtung der in Abbildung 133 aufgeführten Verbindungen wird deutlich, dass sowohl das *E64c-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH (**541**) sowie das CA028-like-(*E*)-Alken-Asp-OH (**557**) die stärksten Hemmungen innerhalb der Gruppe der Alken-Tripeptide aufweisen. Diese Daten wurden übereinstimmend auch für *Papain latex* bestimmt. Für die Diol-Tripeptide konnten die Daten aus dem Latex-Assay bestätigt werden, indem wie zuvor das *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Leucin-OH (**567**) und das CA028-like-(*R,R*)-Diol-Phenylglycin-OH (**588**) die aktivsten Diol-Peptide waren. Das Screening der *E64c-like*-Epoxy-Peptide führte in Bezug auf die aktivste Verbindung zu einer Diskrepanz hinsichtlich der an *Papain latex* bestimmten Hemmwerte. Während gegen *Papain latex* noch *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phg-OH (**599**) die aktivste Verbindung war, führte gegen *Papain carica* das *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**) zu der stärksten Hemmung.

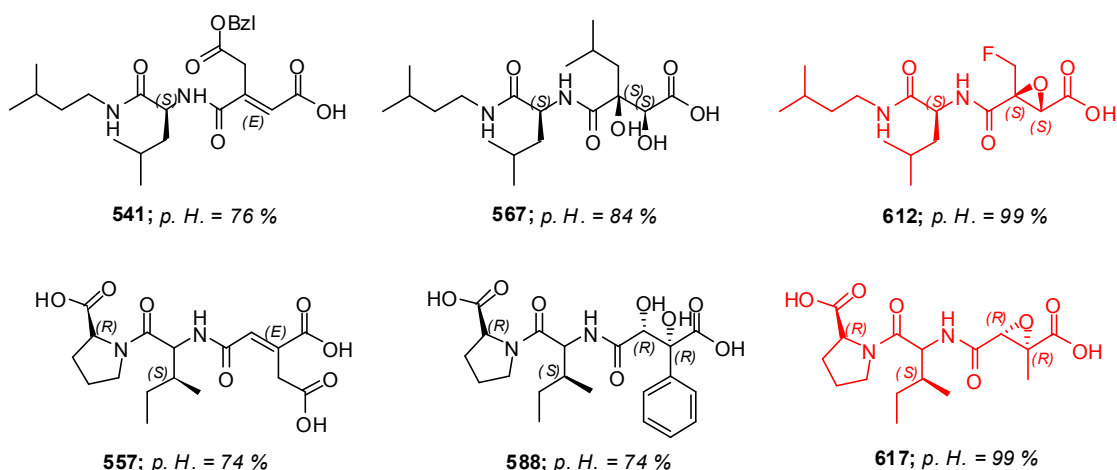


Abbildung 133: Für die *E64c-like*- bzw. CA028-like-Alken-, Diol- und Epoxy-Tripeptide wurden die IC₅₀-Werte und Hemmkonstanten (K_i , k_i , k_{2nd}) bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.2). Die Verbindungen mit den größten Hemmwerten (p.H.%) sind in rot dargestellt.

4.3.1.4 Screening von *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptiden gegen *Cathepsin B*

Zur Ermittlung der Hemmung wurde bei 40 °C ein kontinuierlicher Assay durchgeführt. Die Absorptionszunahme des Spaltprodukts (*p*-Nitroanilin) von Z-Arg-Arg-*p*NA wurde bei $\lambda = 410$ nm über 10 min detektiert.^[52,96,379] Es erfolgte eine Vorinkubation von Enzym und Inhibitoren für 10 min bei 40 °C. Die eingesetzte Inhibitorkonzentration betrug für alle Verbindungen während des Screenings 30 μ M. In Tabelle 10 sind die spezifischen Assaybedingungen der verwendeten Enzyme, ihre Konzentrationen, die Substratkonzentrationen, sowie Puffer und K_m -Werte aufgelistet.

Tabelle 10: Assaybedingungen des Tripeptid-Screenings gegen *Cathepsin B*.

<i>Cathepsin B</i> – Kontinuierlicher Assay			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 6.0	200 mM	115 μ L
Enzym	<i>Cathepsin B</i> (<i>Bovine Spleen</i>); 37.0 U/mg	0.3 μ M	15 μ L
Substrat	Z-Arg-Arg- <i>p</i> NA, K_m (CB): 0.68 mM	1.0 mM	15 μ L
Temperatur	40 °C		
Detektion	$\lambda = 410$ nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Inhibitoren	<i>E64c</i> - bzw. <i>CA028-like</i> -Alken-, -Diol-, -Epoxy-Tripeptide	30 μ M	5 μ L
Volumina	115 μ L [P], 15 μ L [E], 15 μ L [S], 5 μ L [I]		

[P] = Puffer, [E] = Enzym, [S] = Substrat, [I] = Inhibitor

Für die Untersuchung des in P1 eingeführten Substitutionsmuster (über die Reste der „Warhead“-Bausteine) der Inhibitoren hinsichtlich einer induzierten Selektivität innerhalb der Familie der papainähnlichen Cysteinproteasen wurde ein Screening gegen *Cathepsin B* durchgeführt. Die unterschiedliche Geometrie des katalytischen Spalts, als auch die der Substratbindungstaschen im Vergleich zu den anderen Cysteinproteasen (*Papain*, *CatL*) machen *Cathepsin B* zu einem geeigneten Testsystem.

In Abbildung 134 ist anhand der Hemmwerte der *E64c-like*-(*E*)-Alken-Tripeptide eine deutliche Abnahme der Aktivitäten im Vergleich zu den für *Papain latex* bzw. *carica* erhalten Hemmdaten ersichtlich. Im Durchschnitt lagen die p.H. von *Cathepsin B* durch die *E64c-like*-(*E*)-Alken-Peptide um 20% niedriger als die für *Papain latex* und *carica* bestimmten Hemmungen. Für die carboxyterminal-geschützten *E64c-like*-(*E*)-Alken-OtBu-Peptide (**528-534**) wurde keine Bevorzugung eines bestimmten Substitutionsmuster beobachtet, so dass die p.H.-Werte zwischen 30-40% lagen (Abbildung 134a). Eine freie Carboxyfunktion führte bei den meisten *E64c-like*-(*E*)-Alken-OH-Peptide (**535-538**) zu einem leichten Aktivitätsabfall und für das *E64c-like*-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala-OH (**539**) und –Asp-OH (**541**) zu fast identischen Hemmwerten.

4.3.1.4.1 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like-(E)*-Alken-Tripeptide gegen *Cathepsin B*

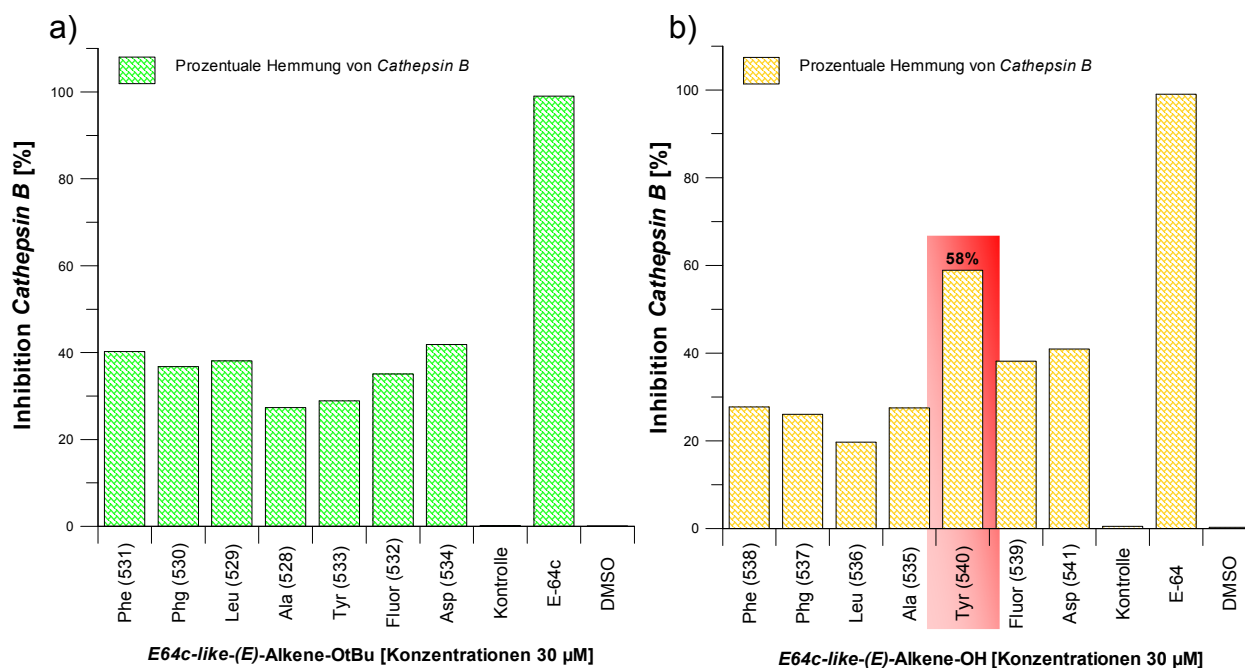


Abbildung 134: Prozentuale Hemmung von *Cathepsin B* (Bovine Spleen) durch die getesteten *E64c-like-(E)*-Alkene (**528-541**) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal-geschützten *E64c-like-(E)*-Alkene-OtBu (**528-534**); b) Hemmwerte der carboxyterminal-entschützten *E64c-like-(E)*-Alkene-OH (**535-541**). Die aktivste Verbindung, *E64c-like-(E)*-Alken-Tyr-OH (**540**) ist rot hinterlegt.

Ausschließlich für das *E64c-like-(E)*-Alken-Tyr-OH (**540**) führte die freie Carboxyfunktion zu einer signifikanten Zunahme der p.H. von 28% für das carboxyterminal-geschützte Alken-Tyr-OtBu (**533**) zu beachtlichen 58% (p.H.) für Tyr-OH (**540**). Eine herausragende Inhibition wurde jedoch für keines der *E64c-like-(E)*-Alken-Tripeptide gegen *Cathepsin B* gefunden. Für die anschließende Charakterisierung der Hemmung wurden die Hemmkonstanten und IC_{50} -Werte für *E64c-like-(E)*-Alken-Tyr-OH (**540**) bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.3).

Bei der Testierung der carboxyterminal-geschützten *CA028-like-(E)*-Alkene-OMe (**543-557**) konnte nur geringfügig eine Selektivität ausgehend von den Substituenten (Seitenketten der „Warheads“) beobachtet werden (Abbildung 135a). Die beiden aliphatischen Verbindungen *CA028-like-(E)*-Alken-Ala-OMe (**543**) und β -Fluor-Ala-OMe (**548**) waren mit p.H.-Werten <50% die schwächsten Inhibitoren. Eine freie Carboxyfunktion führte nur für *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**557**) zu einer repräsentativen Aktivitätszunahme (p.H. 65%), wohingegen für die anderen *CA028-like-(E)*-Alken-OH-Peptide ein drastischer Aktivitätsabfall beobachtet wurde (Abbildung 135b). Für die erhöhte Aktivität von **557** sind möglicherweise die freien Carboxyfunktionen verantwortlich, was für eine Wechselwirkung mit den beiden Histidin-Resten (His¹¹⁰ bzw. His¹¹¹) in der Bindungstasche von *Cathepsin B* sprechen würde.

4.3.1.4.2 Prozentuale Hemmwerte: CA028-like-(E)-Alken-Tripeptide gegen Cathepsin B

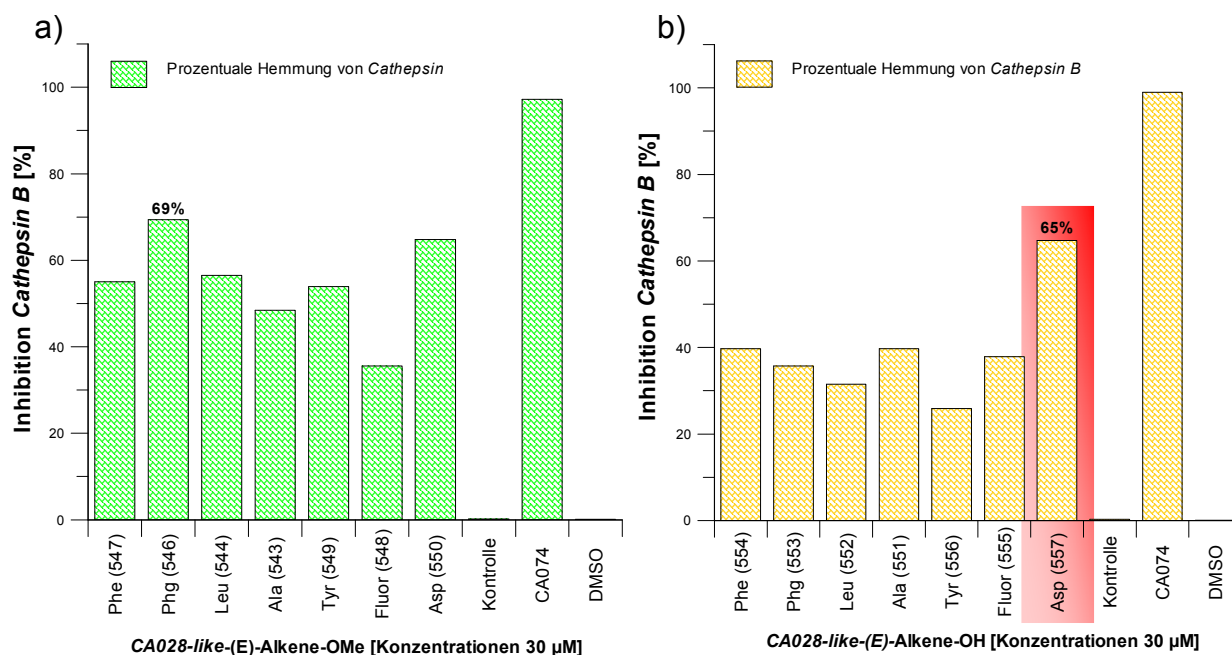


Abbildung 135: Prozentuale Hemmung von *Cathepsin B* (Bovine Spleen) durch die getesteten CA028-like-(E)-Alkene (543-557) bei einer Endkonzentration von 30 μM ; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten CA028-like-(E)-Alkene-OMe (543-550); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten CA028-like-(E)-Alkene-OH (551-557). Die aktivste Verbindung, CA028-like-(E)-Alken-Asp-OH (557) ist rot hinterlegt.

Bei Betrachtung der prozentualen Hemmungen von Cathepsin B durch die *E64c-like*-(S,S)- bzw. -(R,R)-Diol-Tripeptide in Abbildung 136 fällt auf, dass sie im Vergleich zu den für *Papain latex* und *carica* erhaltenen Hemmdaten eine deutlich schwächere Hemmung aufweisen. Interessanterweise konnte sich aber erneut das *E64c-like*-(S,S)-Diol-Leu-OtBu-Peptid (559) infolge seiner Hemmstärke (p.H. 59%) von den anderen carboxyterminal-geschützten *E64c-like*-Diol-Tripeptiden abheben, wie schon zuvor gegen *Papain latex* und *carica*. Besonders hervorzuheben ist jedoch die enorme Aktivitätszunahme von *E64c-like*-(S,S)-Diol-Phg-OH (568) mit einer prozentualen Hemmung von 99% (Abbildung 136b). Infolge der carboxyterminalen Schutzgruppenabspaltung von *E64c-like*-(S,S)-Diol-Phg-OtBu (560) mit einem p.H.-Wert von <30% zu *E64c-like*-(S,S)-Diol-Phg-OH (568) kam es zu einer signifikanten Steigerung der Inhibition zu 99% (p.H.). Präferenzen hinsichtlich eines bestimmten Enantiomers, (S,S) bzw. (R,R) wurden nicht gefunden. Für den Großteil der *E64c-like*-Diol-OH-Peptide führte eine freie Carboxyfunktion zu keinen Veränderungen der Hemmstärken, ausschließlich für 568 und *E64c-like*-(R,R)-Diol-Leu-OH (571) wurde in Verbindung mit der freien Carboxyfunktion eine Zunahme der p.H. beobachtet. Für 568 wurden anschließend die IC_{50} -Werte bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.3).

4.3.1.4.3 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Diol-Tripeptide gegen *Cathepsin B*

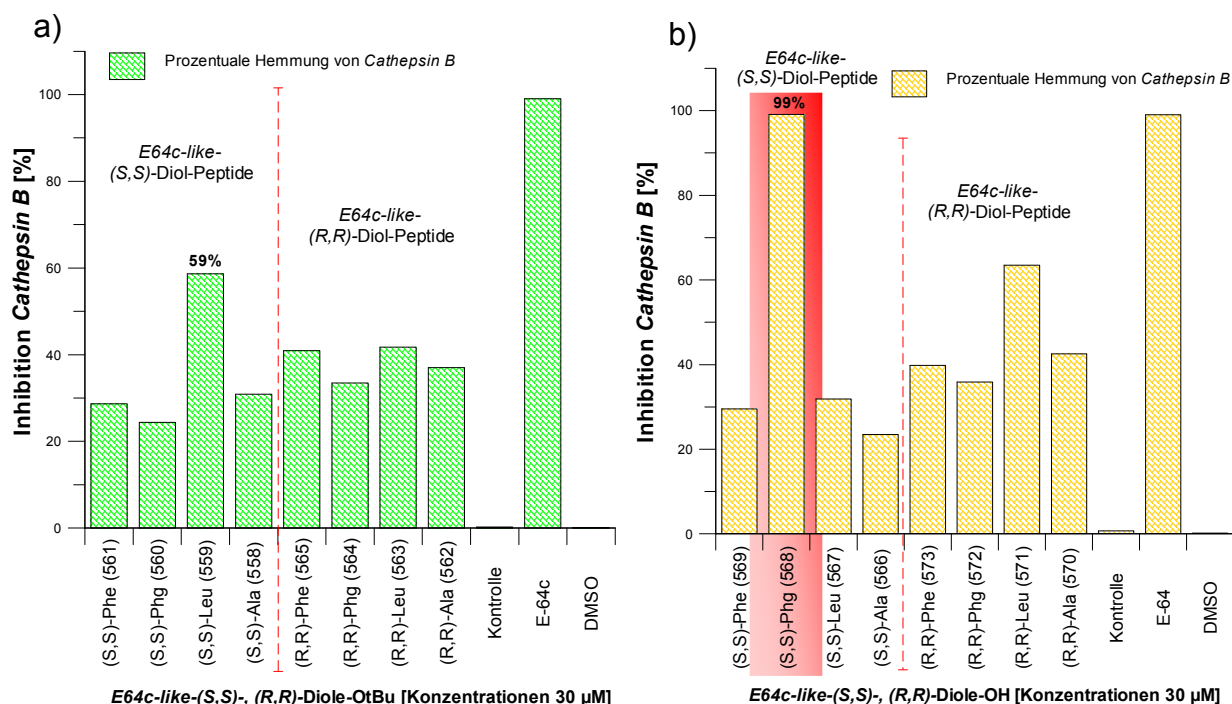


Abbildung 136: Prozentuale Hemmung von *Cathepsin B* (Bovine Spleen) durch die getesteten *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Diols (558-573) bei einer Endkonzentration von 30 μM ; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Diols (558-561) bzw. -(*R,R*)-Diols (562-565); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Diols (566-569) und -(*R,R*)-Diols (570-573). Die aktivste Verbindung, *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Leu-OtBu (559) ist rot hinterlegt.

Das Screening der *CA028-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Diol-Peptide ergab eine deutlich stärkere Hemmung gegenüber *Cathepsin B* als zuvor gegen *Papain latex* bzw. *carica*, wobei der Großteil der carboxyterminal-geschützten (OMe) als auch –entschützten (OH) *CA028-like*-Diol-Peptide *Cathepsin B* in gleichem Maße inhibierten (Abbildung 137). Während für die meisten *CA028-like*-Diol-Peptide weder eine Bevorzugung eines bestimmten Enantiomers (*S,S*) bzw. (*R,R*), oder eine Selektivität bezüglich eines Substituenten (Seitenkette-Diol) beobachtet wurde, führte eine freie Carboxyfunktion für die beiden *CA028-like*-Diol-Peptide, *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Leu-OH (587) und -(*R,R*)-Diol-Phg-OH (588) zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung. Dadurch kann zwar keine eindeutige Bevorzugung der (*R,R*)-konfigurierten *CA028-like*-Diol-Peptide angenommen werden, jedoch ist festzuhalten, dass die aktivsten *CA028-like*-Diol-Peptide (*R,R*)-konfiguriert sind. Interessanterweise war *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (588), wie schon zuvor gegen *Papain latex* und *carica* die aktivste Verbindung mit einer prozentualen Hemmung von 92%. Das Vorhandensein einer freien

Carboxyfunktion scheint im Fall des *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) essentiell für die beachtlichen Hemmwerte zu sein, da die entsprechende geschützte Verbindung **580** nur eine p.H. von 50% aufwies. Die beiden aktivsten *CA028-like*-Diol-Peptide gegen Cathepsin B sind das *E64c-like*-(*S,S*)-Phg-OH (**568**) und das *CA028-like*-(*R,R*)-Phg-OH (**588**), die beide interessanterweise einen identischen Substituenten (Seitenkette-Diol), aber eine inverse Konfiguration des Diols aufweisen. Die genauen IC₅₀-Werte wurden für **588** anschließend bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.3).

4.3.1.4.4 Prozentuale Hemmwerte: *CA028-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Diol-Tripeptide gegen Cathepsin B

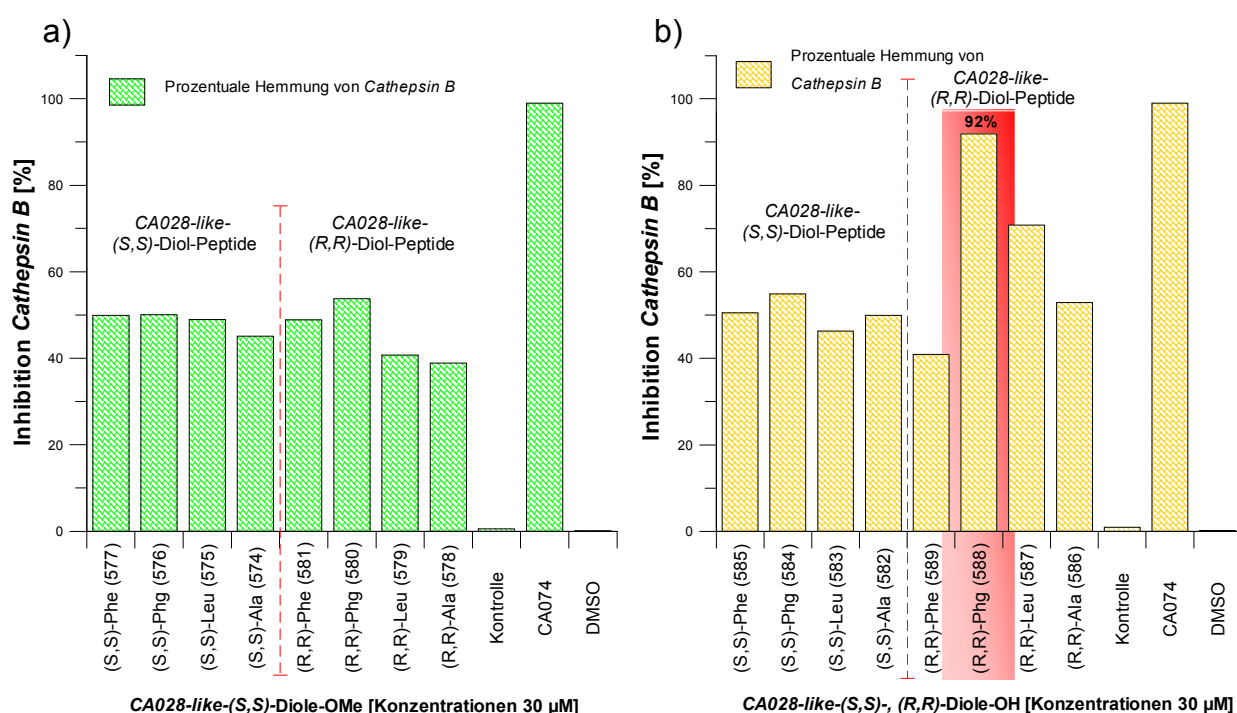


Abbildung 137: Prozentuale Hemmung von Cathepsin B (Bovine Spleen) durch die getesteten *CA028-like*-(*S,S*)- und -(*R,R*)-Diole (**574-589**) bei einer Endkonzentration von 30 µM; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *CA028-like*-(*S,S*)-Diol-OMe (**574-577**) bzw. -(*R,R*)-Diol-OMe (**578-581**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *CA028-like*-(*S,S*)-Diol-OH (**582-585**) und -(*R,R*)-Diol-OH (**586-589**). Die aktivste Verbindung, *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) ist rot hinterlegt.

Das Inhibitionsmuster der *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Epoxy-Peptide (Abbildung 138) gegen Cathepsin B unterscheidet sich größtenteils von dem an *Papain latex* und *carica* gewonnen Daten. Während des Screenings der *E64c-like*-Epoxy-Peptide gegen Cathepsin B wurden für die meisten Verbindungen nur eine schwache Inhibition (p.H. <45%) beobachtet (Abbildung 138). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Aktivitätszunahme und dem

Vorhandensein einer geschützten (OtBu) bzw. freien Carboxyfunktion (OH) konnte ausschließlich für die *E64c-like*-Epoxy-Peptide, (*rac*)-Epoxy-Fluor-Ala-OH (**612**), (*rac*)-Epoxy-Cha-OH (**613**) und (*rac*)-Epoxy-Tyr-OH (**614**) gefunden werden. Eine Präferenz hinsichtlich der beiden Verbindungen, *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy-Fluor-Ala und -(*rac*)-Epoxy-Cha zeichnete sich aber auch schon für deren carboxyterminal-geschützten Vorläufer (*rac*)-Epoxy-Fluor-Ala-OtBu (**594**), (*rac*)-Epoxy-Cha-OtBu (**595**) ab (Abbildung 138a). Mit einer prozentualen Hemmung von 94% war jedoch *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy-Cha-OH (**613**) mit Abstand die aktivste Verbindung, wobei der geschützte Vorläufer **595** auch schon eine p.H. von 78% aufwies. Für das *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy-Chg-OH-Peptid (**613**) wurden anschließend die IC₅₀-Werte und Hemmkonstanten gegen Cathepsin B bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.3).

4.3.1.4.5 Prozentuale Hemmwerte: *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. -(*rac*)-Epoxy-Tripeptide gegen Cathepsin B

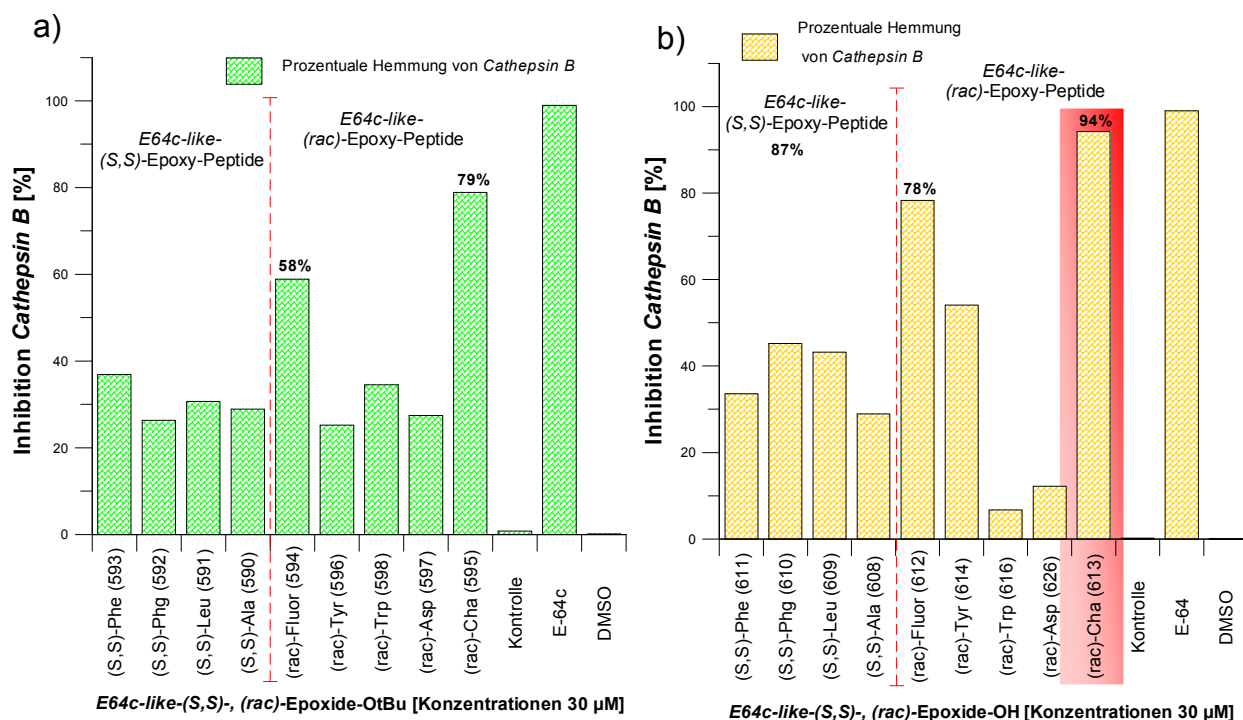


Abbildung 138: Prozentuale Hemmung von Cathepsin B (Bovine Spleen) durch die getesteten *E64c-like*-(*S,S*)- bzw. (*rac*)-Epoxy-Tripeptide (**590-598**, **608-616**) bei einer Endkonzentration von 30 μ M; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-OtBu-Peptide (**590-593**) bzw. (*rac*)-Epoxy-OtBu-Peptide (**594-598**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-OH-Peptide (**608-611**) bzw. (*rac*)-Epoxy-OH-Peptide (**612-616**, **626**). Die aktivste Verbindung, *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy-Cha-OH (**613**) ist rot hinterlegt.

Für die *CA028-like*-(*R,R*)- und -(*rac*)-Epoxy-Tripeptide wurden analog zu den Papain-Hemmdaten ähnliche Werte für die einzelnen *CA028-like*-Epoxy-Peptide ermittelt. Sowohl für *Papain latex* bzw. *carica* als auch Cathepsin B zeichnete sich eine eindeutige Favorisierung hinsichtlich der carboxyterminal ge- bzw. entschützten *CA028-like*-(*S,S*)-Epoxy-Ala-Peptide (**599**, **617**) ab. Gegen Cathepsin B scheint die Aktivität der *CA028-like*-(*S,S*)-Epoxy-Ala-Peptide, zumindest bei einer Konzentration von 30 μM nicht maßgeblich von dem Vorhandensein einer freien Carboxyfunktion abhängig zu sein (Abbildung 139). Für den Großteil der *CA028-like*-Epoxy-Peptide verhielt es sich aber deutlich anders, so dass es für die *CA028-like*-Epoxy-OH-Peptide, (*rac*)-Epoxy-Phe-OH (**620**), (*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**621**) und (*rac*)-Epoxy-Chg-OH (**622**) aufgrund der freien Carboxyfunktion zu einer deutlichen Zunahme der prozentualen Hemmwerte kam. Für *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**) wurden anschließend die Hemmkonstanten bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.3).

4.3.1.4.6 Prozentuale Hemmwerte: *CA028-like*-(*R,R*)- bzw. -(*rac*)-Epoxy-Tripeptide gegen Cathepsin B

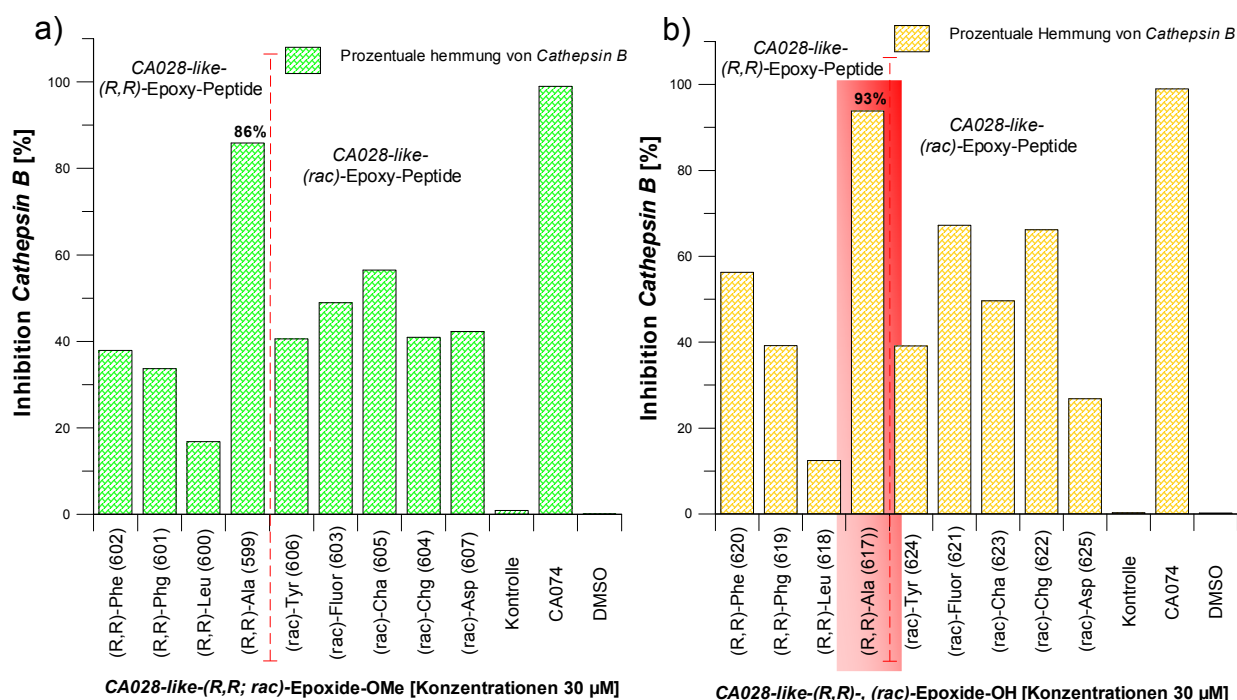


Abbildung 139: Prozentuale Hemmung von Cathepsin B (Bovine Spleen) durch die getesteten *CA028-like*-(*R,R*)- bzw. -(*rac*)-Epoxy-Tripeptide (**599-607**, **617-625**) bei einer Endkonzentration von 30 μM ; a) Hemmwerte der carboxyterminal geschützten *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-OMe-Peptide (**599-602**) bzw. -(*rac*)-Epoxy-OMe-Peptide (**603-607**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-OH-Peptide (**617-620**) bzw. -(*rac*)-Epoxy-OH-Peptide (**621-625**). Die aktivste Verbindung, *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**) ist rot hinterlegt.

In Abbildung 140 sind nochmals die gegen Cathepsin B aktivsten *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide aufgeführt. Das *E64c-like*-(*E*)-Alken-Tyr-OH (**540**) sowie das *CA028-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH (**557**) führten zur stärksten Inhibition innerhalb der Gruppe der Alken-Peptide, wobei **540** (p.H. 58%) eine schwächer Hemmung als **557** (p.H. 67%) aufwies. Die prozentualen Hemmwerte der aktivsten *E64c*- bzw. *CA028-like*-Diol-Peptide, *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH (**568**) und *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) mit >90% (p.H.) sind nahezu identisch. Das Screening der *E64c*- und *CA028-like*-Epoxy-Peptide gegen Cathepsin B ergab eine beachtliche Hemmung (p.H. >90%) durch *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy-Cha-OH (**613**) als auch *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**).

Genauere Aussagen hinsichtlich des inhibitorischen Potentials der aufgeführten Verbindungen (Abbildung 140) können zu diesem Zeitpunkt keine gemacht werden. Das eigentliche Potential der ausgewählten *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide kann erst nach Bestimmung der IC₅₀-Werte und Hemmkonstanten beurteilt werden.

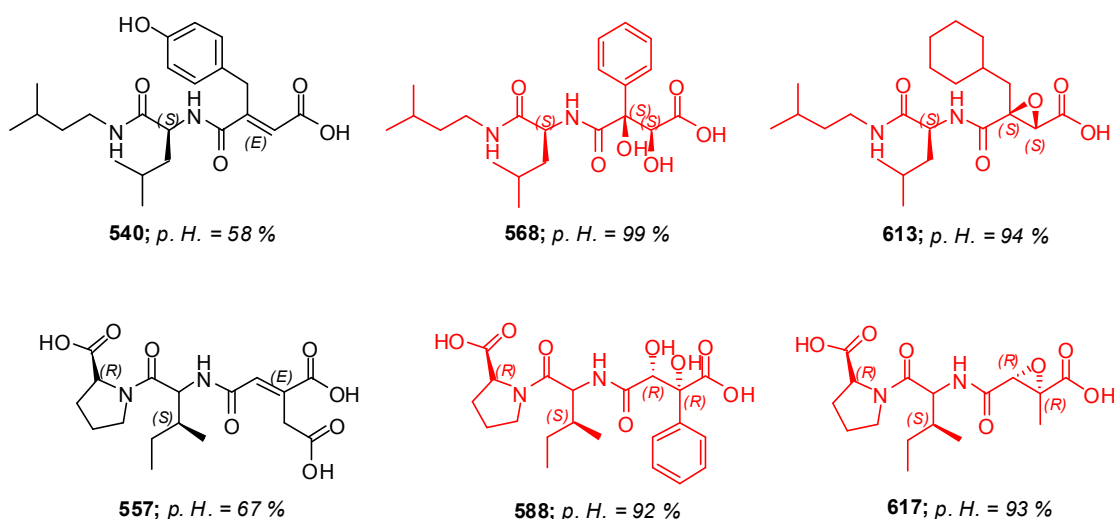


Abbildung 140: Für die aufgeführten *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Alken-, Diol- und Epoxy-Tripeptide wurden die IC₅₀-Werte und Hemmkonstanten (K_i , k_i , k_{2nd}) bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.3). Tripeptide mit Hemmwerten (p.H.[%]) >90% sind in rot dargestellt.

4.3.1.5 Screening von *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptiden gegen *Cathepsin L*

Zur Ermittlung der Hemmung wurde bei 30 °C ein kontinuierlicher Assay durchgeführt. Die Absorptionszunahme des Spaltprodukts (*p*-Nitroanilin) von Z-Phe-Arg-pNA wurde bei $\lambda = 410$ nm über 10 min detektiert.^[52,96,379] Es erfolgte eine Vorinkubation von Enzym und Inhibitoren für 10 min bei 30 °C. Die eingesetzte Inhibitorkonzentration betrug für alle Verbindungen während des Screenings 30 μ M. In Tabelle 11 sind die spezifischen Assaybedingungen der verwendeten Enzyme, ihre Konzentrationen, die Substratkonzentrationen, sowie Puffer und K_m -Werte aufgelistet.

Tabelle 11: Assaybedingungen des Tripeptid-Screenings gegen *Cathepsin L*.

<i>Cathepsin L</i> – Kontinuierlicher Assay			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	NaCH ₃ COO ⁻ (340 mM), CH ₃ COOH (60 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 5.5	400 mM	115 μ L
Enzym	<i>Cathepsin L</i> (<i>Human liver</i>) (6.354 mU/mg)	0.2 μ M	15 μ L
Substrat	Z-Phe-Arg-pNA, K_m (CL): 0.19 mM	0.5 mM	15 μ L
Temperatur	30 °C		
Detektion	$\lambda = 410$ nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Inhibitoren	<i>E64c</i> - bzw. <i>CA028-like</i> - Alken-, -Diol, -Epoxy-Tripeptide	30 μ M	5 μ L
Volumina	115 μ L [P], 15 μ L [E], 15 μ L [S], 5 μ L [I]		

[P] = Puffer, [E] = Enzym, [S] = Substrat, [I] = Inhibitor

Wegen der enormen Kosten von *Cathepsin L* wurde nur eine kleine Vorauswahl an *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptiden für das Screening eingesetzt. Eine weitere Differenzierung hinsichtlich des Einflusses der in P1 eingeführten Substitutionsmuster (Seitenketten der „Warheads“) innerhalb der papainähnlichen Cysteinproteasen sollte anhand von *Cathepsin L* näher bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der zuvor erhalten Hemmdaten der Tripeptide gegen die Papaine (*latex* bzw. *carica*) und *Cathepsin B* wurde repräsentativ für die Gruppe der *E64c-like*-(*E*)-Alken-Peptide folgende Vorauswahl getroffen: -Alken-Phg-OH (**537**), -Alken- β -Fluor-Ala-OH (**539**), -Alken-Tyr-OH (**540**) und -Alken-Asp-OH (**541**), und deren inhibitorisches Potential gegen CatL untersucht (Abbildung 141a). Mit einer prozentualen Hemmung von 53% war das *E64c-like*-(*E*)-Alken-Phg-OH-Peptid (**537**) die aktivste *E64c-like*-Alken-Verbindung, wobei sich die p.H.-Werte der *E64c-like*-Alkene nur geringfügig unterscheiden. In Bezug auf die Stärke der Hemmung konnte hinsichtlich der getesteten Substitutionsmuster der *E64c-like*-(*E*)-Alken-Peptide kaum eine Abhängigkeit beobachtet werden. Für die *CA028-like*-(*E*)-Alken-Tripeptide wurde bezüglich der Substitutionsmuster eine identische Auswahl wie für die *E64c-like*-Alkene eingesetzt (Abbildung 141). Auf ihre inhibitorische Aktivität hin wurden das *CA028-like*-(*E*)-Alken-Phg-OH (**546**), -

(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala-OH (**555**), -(*E*)-Alken-Tyr-OH (**556**) und -(*E*)-Alken-Asp-OH (**557**) untersucht (Abbildung 141b). Interessanterweise hemmte das CA028-like-(*E*)-Alken-Asp-OH-Peptid (**557**) wie auch schon zuvor die anderen Proteasen, Cathepsin L am stärksten, wobei das CA028-like-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala-OH-Peptid (**555**) eine annähernd identische Hemmung aufwies. Eine beachtliche Hemmung von CatL, wurde jedoch für keines der *E64c*- bzw. CA028-like-Alken-Peptide beobachtet.

4.3.1.5.1 Prozentuale Hemmwerte: *E64c*- und CA028-like-(*E*)-Alken-Tripeptide gegen Cathepsin L

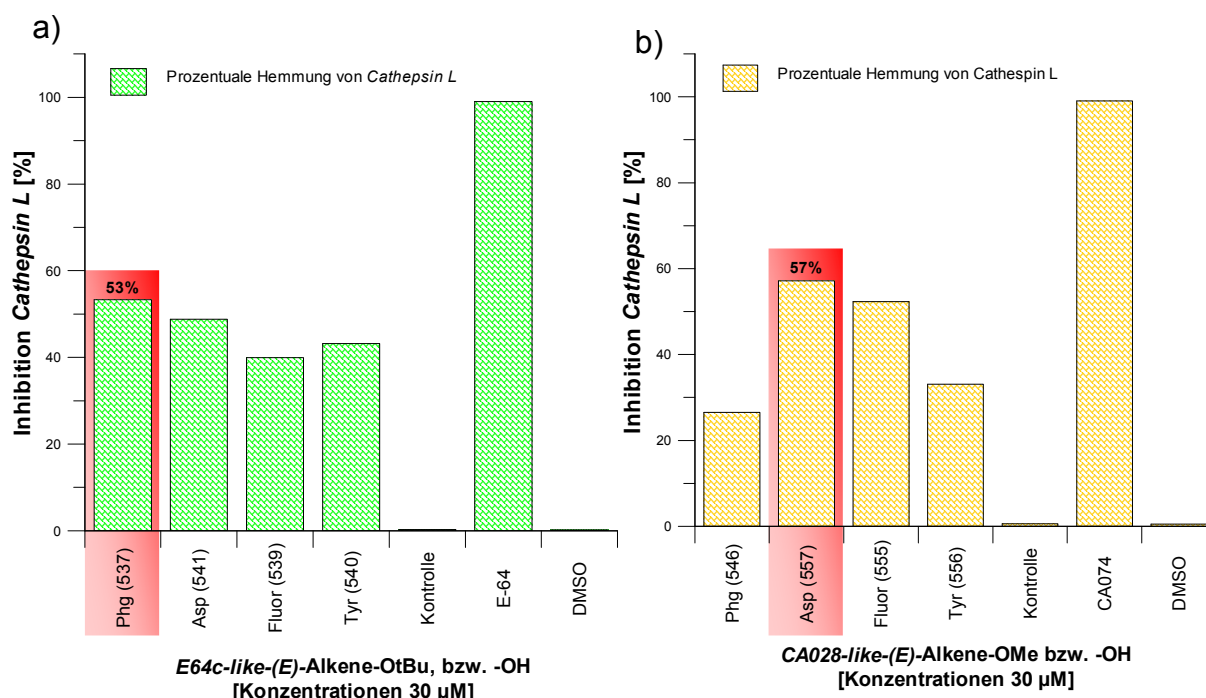


Abbildung 141: Prozentuale Hemmung von *Cathepsin L* (human liver) durch die getesteten *E64c*- und CA028-like-(*E*)-Alkene bei einer Endkonzentration von 30 μ M; a) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten *E64c*-like-(*E*)-Alkene-OH (**537**, **539-541**); b) Hemmwerte der carboxyterminal entschützten CA028-like-(*E*)-Alkene-OH (**546**, **555-557**). Die aktivsten Verbindung, *E64c*-like-(*E*)-Alken-Phg-OH (**537**) bzw. CA028-like-(*E*)-Alken-Asp-OH (**557**) sind rot hinterlegt.

Die Hemmwerte der *E64c*- und CA028-like-Diol-Tripeptide blieben weit hinter den für *Papain latex* bzw. *carica* und Cathepsin B bestimmten Werten zurück (Abbildung 142). Auch für die Diol-Tripeptide wurde unter Berücksichtigung der zuvor erhalten Hemmdaten gegen *Papain latex* bzw. *carica* und Cathepsin B eine Vorauswahl getroffen. Repräsentativ für die Gruppe der *E64c*-like-Diole wurden sowohl die carboxyterminal-geschützten (*S,S*)-Diol-Phg-OtBu- (**560**) und (*R,R*)-Diol-Leu-OtBu-Peptide (**563**) als auch die entsprechenden Derivate mit freier

Carboxyfunktion (S,S)-Diol-Phg-OH (**568**) und (R,R)-Diol-Leu-OH (**571**) auf ihre inhibitorische Aktivität gegen CatL untersucht (Abbildung 142a). Das *E64c-like*-(R,R)-Diol-Leu-OH (**571**) wies die stärkste Hemmung (p.H. 67%) innerhalb der Gruppe der *E64c-like*-Diole auf. Eine deutliche Präferenz hinsichtlich eines Enantiomers, (S,S) bzw. (R,R) konnte für die *E64c-like*-Diol-Peptide nicht beobachtet werden. Für die *E64c-like*-Diol-Peptide, (S,S)-Diol-Phg-OH (**568**) und (R,R)-Diol-Leu-OH (**571**) mit freier bzw. entschützter Carboxyfunktion wurden im Vergleich zu den geschützten Vorläufer-Peptiden **560** und **563** eine deutliche Zunahme der prozentualen Hemmwerte gefunden.

4.3.1.5.2 Prozentuale Hemmwerte: *E64c*- und *CA028-like*-(S,S)-, bzw. -(R,R)-Diol-Tripeptide gegen Cathepsin L

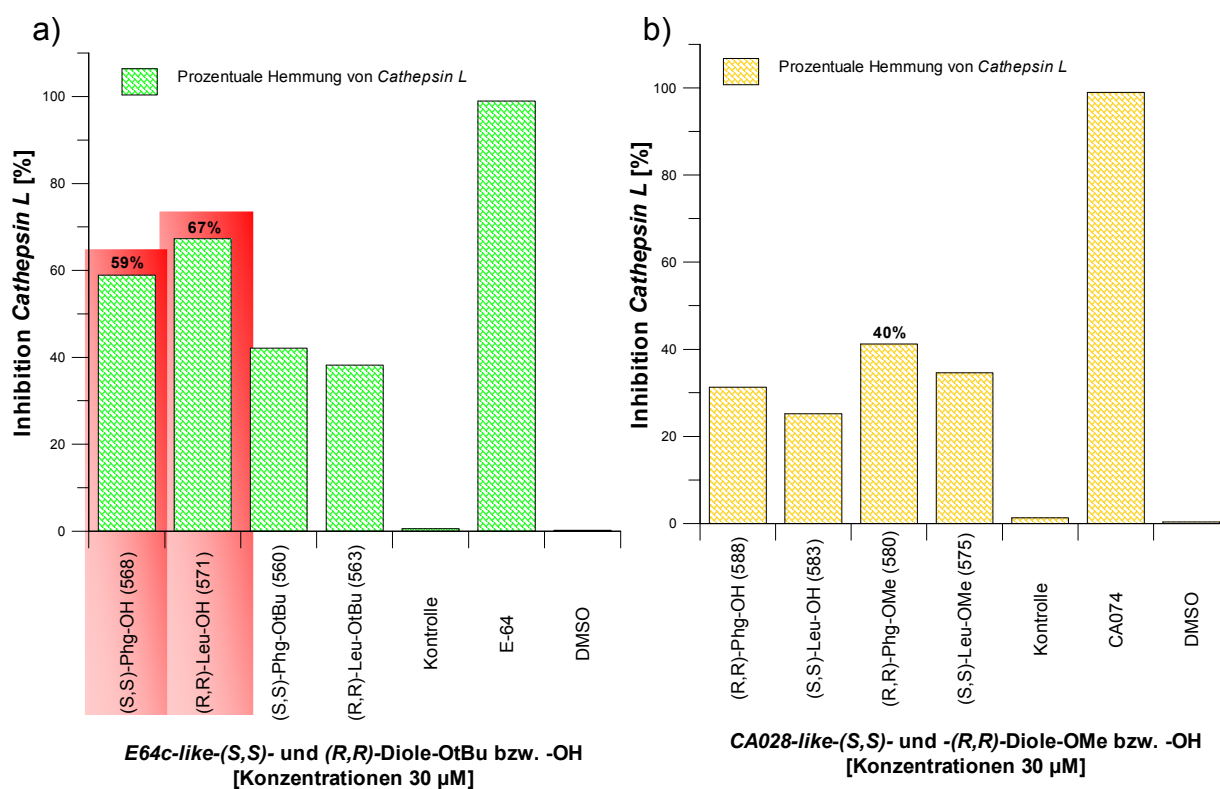


Abbildung 142: Prozentuale Hemmung von Cathepsin L (*human liver*) durch die getesteten *E64c*- bzw. *CA028-like*-(S,S)- und (R,R)-Diole bei einer Endkonzentration von 30 μ M; a) Hemmwerte der *E64c-like*-(S,S)- (**560**, **568**) und (R,R)-Diole (**563**-**571**) b) Hemmwerte der *CA028-like*-(S,S)- (**575**, **583**) und -(R,R)-Diole (**580**, **588**). Die aktivsten Verbindungen, *E64c-like*-(R,R)-Diol-Leu-OH (**571**) bzw. (S,S)-Diol-Phg-OH (**568**) sind rot hinterlegt.

Die Auswahl der *CA028-like*-Diol-Peptide hemmten (p.H. <45%) Cathepsin L nur schwach (Abbildung 142). Das carboxyterminal geschützte *CA028-like*-(R,R)-Diol-Phg-OMe (**580**) wies die stärkste Hemmung auf, wobei sich die für CatL bestimmten prozentualen Hemmwerte der *CA028-like*-Diol-Peptide kaum unterscheiden, und infolge dessen auch

keine deutliche Bevorzugung eines bestimmten Enantiomers, (*S,S*) bzw. (*R,R*), oder eines Substituenten beobachtet wurde. Eine freie Carboxyfunktion führte für die *CA028-like*-Diol-Peptide zu einer Abnahme der Hemmung. Generell waren die *CA028-like*-Diol-Peptide die schwächsten Inhibitoren gegen Cathepsin L, so dass für keines der *CA028-like*-Diol-Peptide die genauen IC_{50} -Werte bestimmt wurden.

4.3.1.5.3 Prozentuale Hemmwerte: *E64c*- und *CA028-like*-Epoxy-Tripeptide gegen *Cathepsin L*

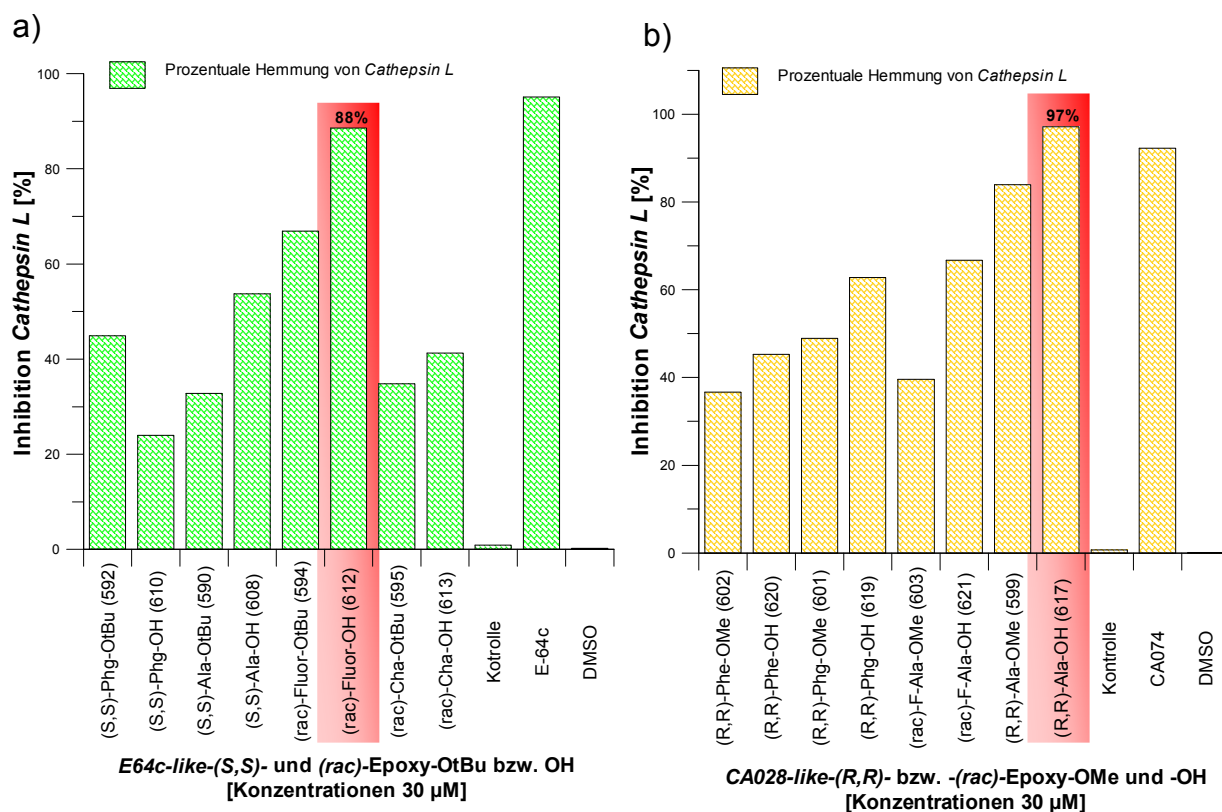


Abbildung 143: Prozentuale Hemmung von *Cathepsin L* (*human liver*) durch die getesteten *E64c*- bzw. *CA028-like*-Epoxy-Peptide bei einer Endkonzentration von 30 μ M; a) Hemmwerte der *E64c-like*-(*S,S*)- (590, 592, 608, 610) und -(*rac*)-Epoxy-Peptide (594, 595, 612, 613); b) Hemmwerte der *CA028-like*-(*R,R*)- (599, 601, 602, 617, 619, 620,) und -(*rac*)-Epoxy-Peptide (603, 621). Die aktivsten Verbindungen, *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy-Fluor-Ala-OH (612) bzw. *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (617) sind rot hinterlegt.

Für die Auswahl der getesteten *E64c-like*-Epoxy-Peptide (Abbildung 144a) wurde eine deutliche Präferenz hinsichtlich des carboxyterminal-geschützten (595) bzw. -entschützten (*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH-Peptids (612) gefunden. Das Vorhandensein einer freien Carboxyfunktion (-OH) führte für die meisten *E64c-like*-Epoxy-Peptide zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität im Vergleich zu den geschützten Verbindungen. Die deutlichsten Steigerungen der prozentualen Hemmwerte infolge einer freien Carboxyfunktion wurden für

E64c-like-(*S,S*)-Epoxy-Ala-OH (**608**, p.H. 55%) bzw. -(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**, p.H. 88%) gefunden. Innerhalb der Auswahl der *CA028-like*-Epoxy-Peptide setzte sich das *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-Peptid, sowohl mit geschützter (**599**) als freier Carboxyfunktion (**617**) hinsichtlich seiner Hemmstärken (p.H. 86% bzw. 94%) deutlich von den anderen *CA028-like*-Epoxy-Peptiden ab (143b). In Bezug auf das Vorhandensein einer freien Carboxyfunktion konnte für alle getesteten *CA028-like*-Epoxy-Peptide eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden.

In Abbildung 144 sind nochmals die gegen Cathepsin L aktivsten *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide aufgeführt. Das *E64c-like*-(*E*)-Alken-Phg-OH (**540**) sowie das *CA028-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH (**557**) führten zur stärksten Inhibition innerhalb der Gruppe der Alken-Peptide. Die prozentualen Hemmwerte der aktivsten *E64c-like*-Diol-Peptide, -(*S,S*)-Diol-Phg-OH (**568**) bzw. -(*R,R*)-Diol-Leu-OH (**571**) lagen deutlich über den nahezu inaktiven *CA028-like*-Diol-Peptiden, so dass für die anschließende Bestimmung der IC_{50} -Werte ausschließlich die beiden *E64c-like*-Diol-Peptide **568** und **571** vermessen wurden. Das Screening der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Epoxy-Peptide gegen Cathepsin L ergab eine beachtliche Hemmung (p.H. >85%) durch *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**) als auch *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**). Das eigentliche Potential der aktivsten Verbindungen soll wie auch schon für die vorhergehenden Enzyme anhand der Hemmkonstanten erfolgen (s. Abschnitt 4.2.3.4).

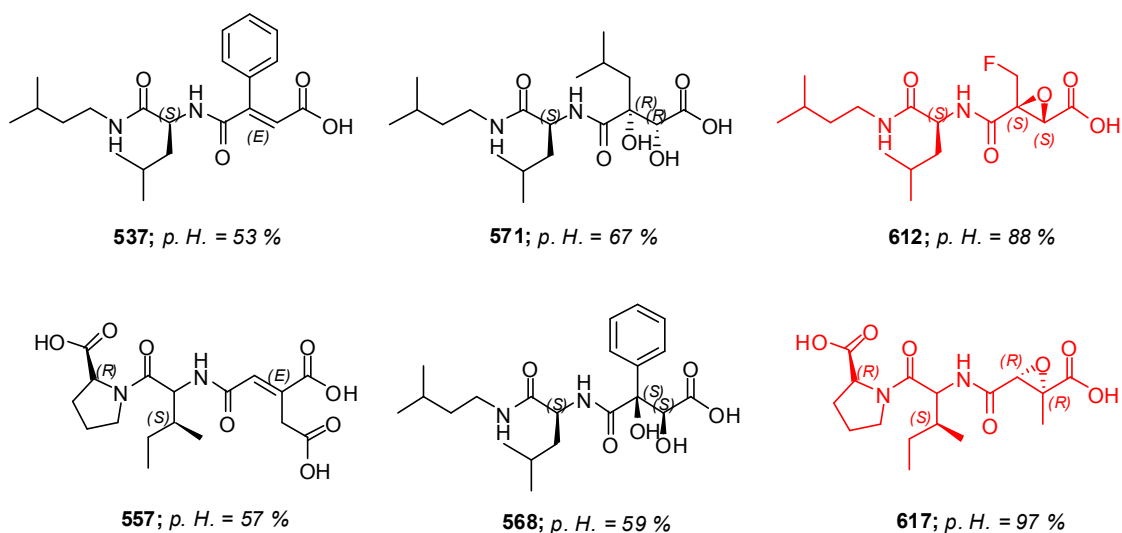


Abbildung 144: Für die aufgeführten *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Alken-, Diol- und Epoxy-Tripeptide wurden die IC_{50} -Werte bzw. Hemmkonstanten (K_i , k_i , k_{2nd}) bestimmt (s. Abschnitt 4.3.2.4). Tripeptide mit Hemmwerten (p.H.%) >85% sind in rot dargestellt.

4.3.2 Bestimmung der IC_{50} -Werte und Hemmkonstanten von E64c- und CA028-like-Tripeptiden gegen Papain, Cathepsin B und L

Für die während des Screenings ermittelten aktivsten Verbindungen, wurde zum einen eine Messung nach einer Inkubationszeit (Enzym + Inhibitor) von 30 Minuten durchgeführt (erster Eindruck über die Zeitabhängigkeit der Hemmung) und zum anderen wurden die genauen Hemmkonstanten für eine nähere Charakterisierung bestimmt:

- IC_{50} -Werte nach verschiedenen Inkubationszeiten
- k_i , K_i und k_{2nd} -Werte

Unter dem vorhergehenden Screening analogen Bedingungen (Temperatur, Puffer, Volumina, Detektion, Substrat- und Enzymkonzentration) wurde ein Verdünnungsassay durchgeführt.^[96,379] Diese aufwendige Assay-Methode wurde gewählt, da die Enzym-Substrat-Kurve nur über ca. 20 min linear verlief und dadurch eine Messung der zeitabhängigen, irreversiblen Inaktivierung nicht möglich gewesen wäre. Ein erster Test bei gleicher Inhibitorkonzentration und längerer Inkubationszeit (30 min) sollte einen ersten Hinweis auf die Zeitabhängigkeit der Hemmung geben. Bei irreversibler Hemmung sollte eine längere Inkubationszeit auch eine größere prozentuale Hemmung ergeben. Für die Bestimmung der Hemmkonstanten wurde die Enzymaktivität bei elf unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen, sowie für fünf unterschiedliche Inkubationszeiten über 30 min gemessen. Als Nullkontrolle diente eine Lösung, die nur DMSO enthielt. Für jede Substanz wurden drei Messungen durchgeführt. Für die irreversiblen Inhibitoren wurde neben den IC_{50} -Werten auch der k_{2nd} -Wert ermittelt, da er für die Beschreibung der Hemmstärke von irreversiblen Inhibitoren besser geeignet ist. Grund hierfür ist, dass dieser Wert nicht, wie der IC_{50} -Wert von der Inkubationszeit, dem Substrat sowie dessen Konzentration und dem K_m -Wert abhängig ist. Für die getesteten Verbindungen stellten die verwendeten Inhibitorkonzentration Sättigungsbedingungen ($[I] \gg K_i$) dar, so dass es möglich war, die einzelnen Hemmparameter der zeitabhängigen Hemmung k_i (Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung) und K_i (Dissoziationskonstante) zu bestimmen. Dies ermöglicht eine Aussage, ob die Hemmung aufgrund schneller Reaktion (großer k_i) oder hoher Affinität (kleiner K_i) zustande kommt. Im folgenden Abschnitt sind exemplarisch Diagramm dargestellt, anhand derer die Ermittlung der Hemmkonstanten veranschaulicht werden soll. Die Auswertung erfolgte mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit 6.0®. Das Umsatz-Zeit-Diagramm (Abbildung 145) bei dem auf der Y-Achse die Absorptionszunahme $[A]$ und auf der X-Achse die Zeit t [min] aufgetragen sind, zeigt noch einmal die Hemmwirkung einzelner Verbindungen während des Screenings gegen Cathepsin L.

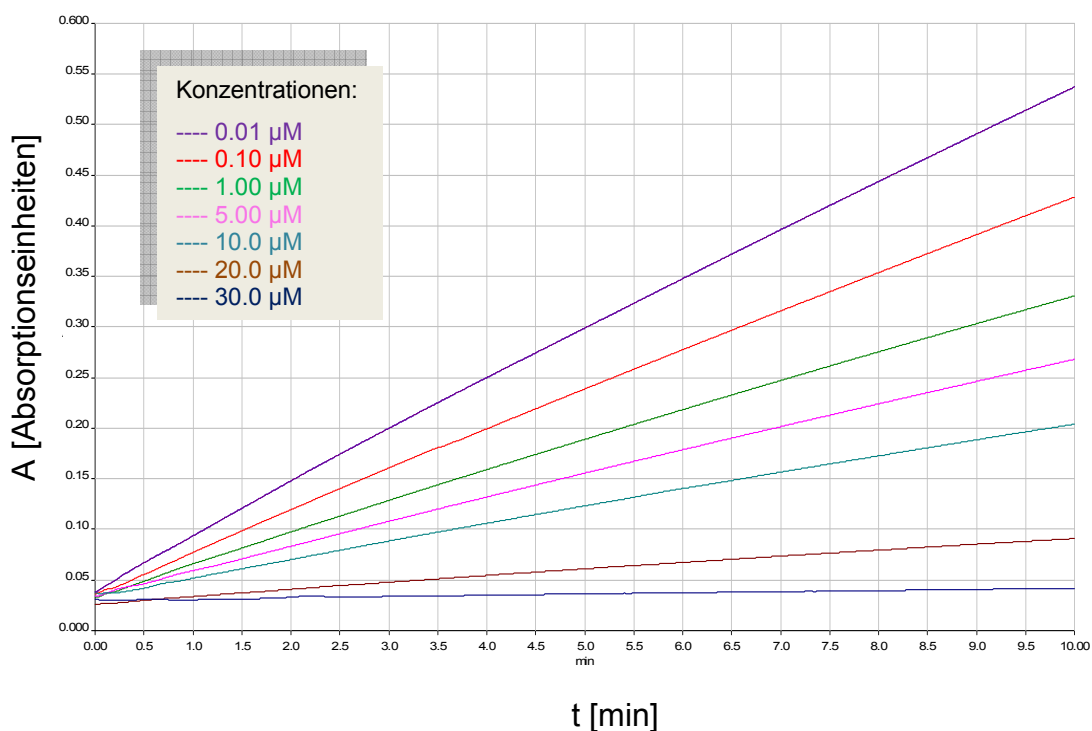


Abbildung 145: Umsatz-Zeit-Diagramm des Screenings von *E64c-like-(rac)*-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**) gegen Cathepsin L.

Die in den folgenden Tabellen aufgeführten, mit längerer Inkubationszeit sinkenden IC_{50} -Werte zeigen, wie schon mehrmals erwähnt, die Irreversibilität der Hemmung. Diese Zeitabhängigkeit zeigt sich auch anhand des irreversiblen *E64c-like-(E)*-Alkene-Asp-OH-Peptids (**541**) am Absinken der Restaktivität im Laufe der Messung über die Zeit (Abbildung 146).

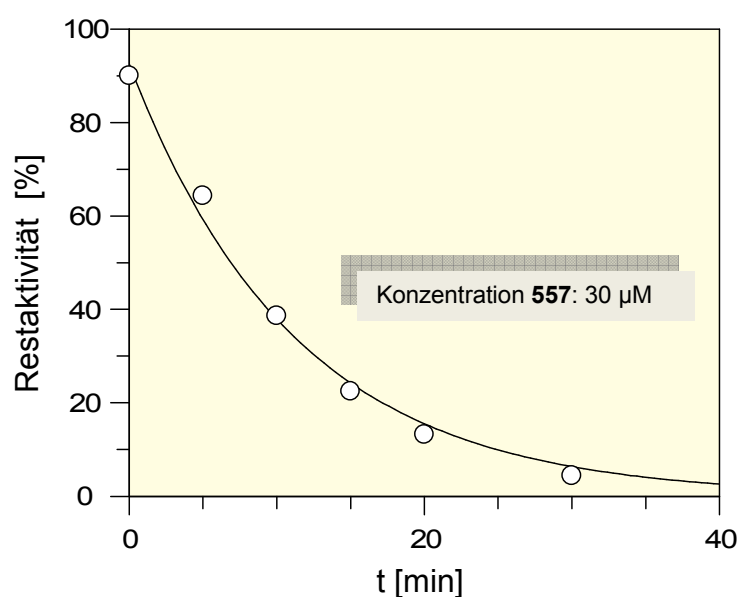


Abbildung 146: Zeitabhängige Hemmung von Cathepsin B durch *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**557**), Konzentration [30 μM] (Verdünnungsassay).

Durch Auftragen der Restaktivitäten (Y-Achse) gegen die Inhibitorkonzentration (X-Achse) für die Messungen zu einer bestimmten Inkubationszeit (1, 5, 10, 15, 20, 30 min) kann der IC_{50} -Wert bestimmt werden. Da der IC_{50} -Wert neben anderen Faktoren, wie Substrat bzw. Substratkonzentration und K_m -Wert, auch von der Inkubationszeit abhängig ist, muss diese immer angegeben werden.^[265,266] In Abbildung 147 ist die IC_{50} -Kurve von *CA028-like-R,R*-Diol-Phg (**588**) nach einer Inkubationszeit von 5 min wiedergegeben.

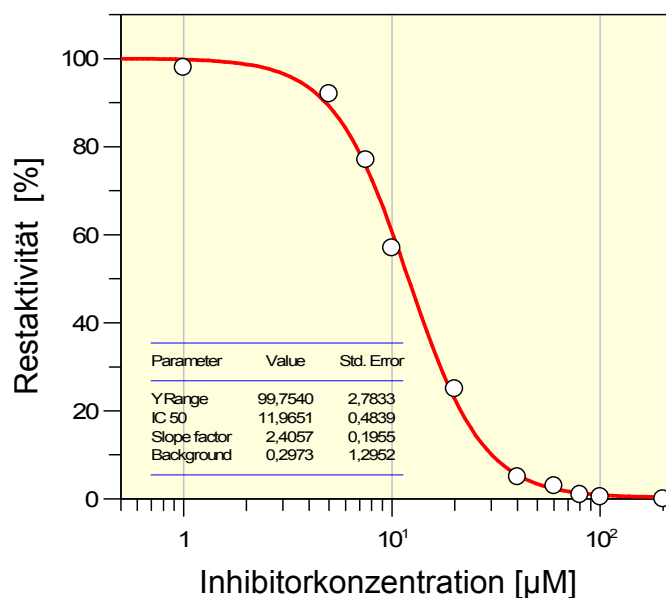


Abbildung 147: IC_{50} -Kurve (Hill-Slope-Modell) von *CA028-like-(R,R)*-Diol-Phg-OH (**588**) nach 5 min Inkubation; $IC_{50} = 12 \pm 0.5 \mu M$ (*Papain carica*).

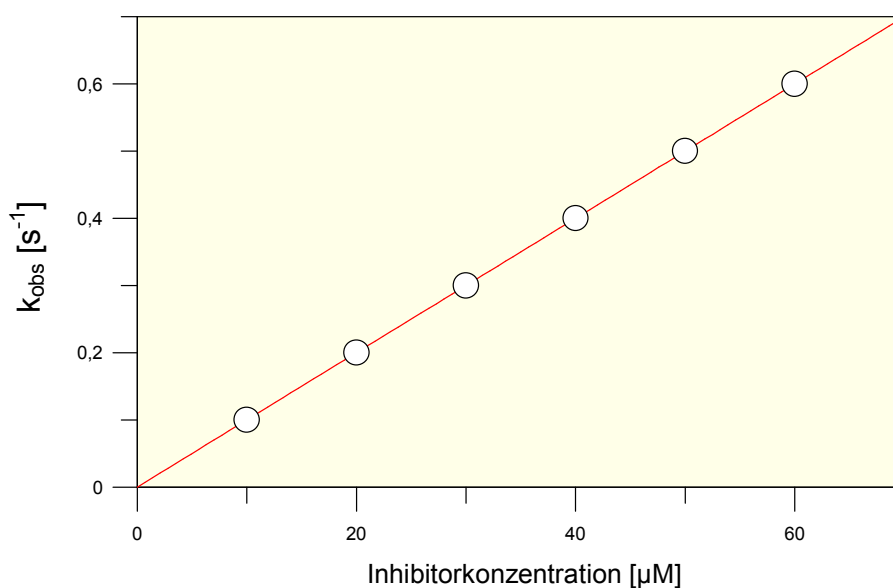


Abbildung 148: Diagramm $k_{obs} / [I]$ von *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**557**) zur Ermittlung von k_{2nd} ; $k_{2nd} = 164 \pm 9 M^{-1} s^{-1}$ (*Papain carica*).

Einen besseren Vergleich der Hemmstärke bietet der k_{2nd} -Wert, da dieser im Gegensatz zum IC_{50} -Wert unabhängig von der Inkubationszeit, Substrat, und dessen Konzentration sowie dem K_m -Wert ist. Bei der Ermittlung des k_{2nd} -Wertes^[265,266] unterscheidet man zwei Situationen. Zum einen die Auswertung bei schlecht löslichen Inhibitoren, bei denen keine Sättigung erreicht wird ($[I] \ll K_i$). In diesem Fall kann k_{2nd} durch Auftragen der k_{obs} -Werte gegen die Inhibitorkonzentration ($[I]$) nur näherungsweise aus der Steigung der Geraden ermittelt werden (Abbildung 149).

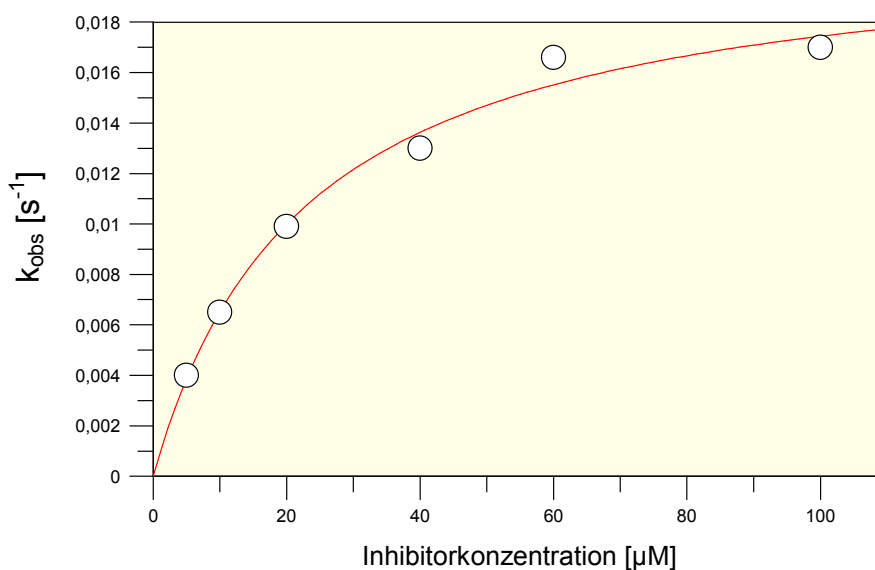


Abbildung 149: Diagramm $k_{obs} / [I]$ von *CA028-like-(R,R)-Epoxy-Ala-OH (617)* zur Ermittlung von k_{2nd} ; $k_i = 0.030 \text{ s}^{-1}$, $K_i = 16.3 \text{ μM}$, $k_{2nd} = 1840 \pm 230 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (*Papain latex*).

Anders gestaltet sich die Auswertung, wenn der Sättigungsbereich ($[I] \gg K_i$) schnell erreicht wird (Abbildung 149 und 150). In diesem Fall können die einzelnen Parameter der zeitabhängigen Hemmung k_i (Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung) als auch K_i (Dissoziationskonstante) bestimmt werden. Dies ermöglicht eine präzise Aussage, ob die Hemmung aufgrund schneller Reaktion (großer k_i) oder starker Affinität (kleiner K_i) zustande kommt.^[265,266]

Für die Mehrheit der getesteten Verbindungen konnte mittels des Verdünnungsassays eine höhere prozentuale Hemmung bei längerer Inkubation als auch sinkende IC_{50} -Werte bestimmt werden. Das spricht deutlich für eine irreversible Hemmung. Nur für *CA028-like-(E)-Alken-Phg-OH (557)* war anhand der ermittelten Werte keine sichere Aussage über die „Art“ der Hemmung von Cathepsin L möglich. Unter den zuvor ermittelten besten Assaybedingungen^[vi] für das jeweilige Enzym wurden die folgende IC_{50} -Werte und

^[vi] für eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus siehe experimenteller Teil dieser Arbeit.

Hemmkonstanten für die Auswahl an *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptiden bestimmt. Die genauen Konzentration und Reagenzien, sowie die ermittelten IC_{50} - und k_{2nd} -Werte sind für jedes Enzym in einer Tabelle wiedergegeben.

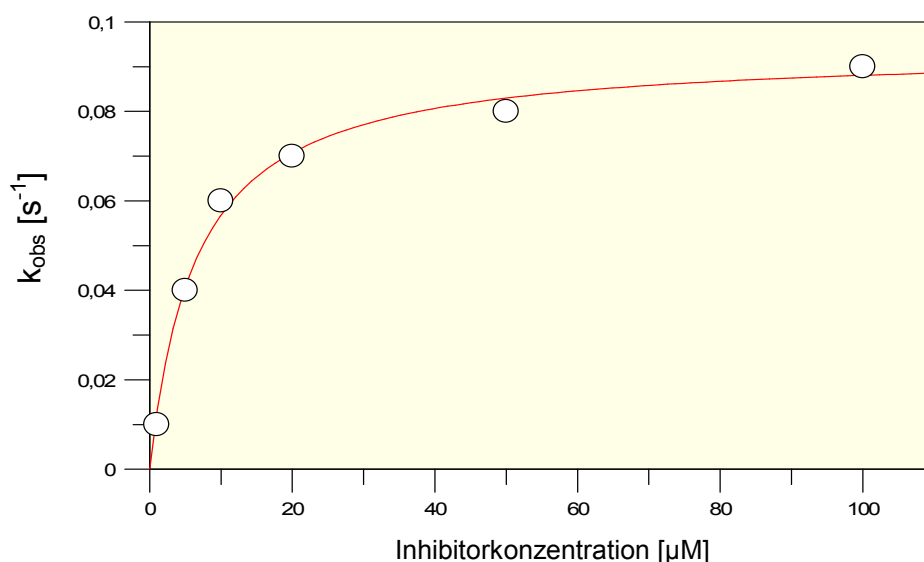


Abbildung 150: Diagramm $k_{obs} / [I]$ von *E64c-like*-(S,S)-Epoxy-Phg-OH (**612**) zur Ermittlung von k_{2nd} ; $k_i = 0,036 s^{-1}$, $K_i = 0,16 \mu M$, $k_{2nd} = 56756 \pm 1150 M^{-1} s^{-1}$ (*Papain latex*).

4.3.2.1 Bestimmung der IC_{50} -Werte und Hemmkonstanten ausgewählter *E64c-like*- und *CA028-like*-Tripeptide gegen *Papain latex*

Tabelle 12: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des Verdünnungsassays gegen *Papain latex* für die Bestimmung der IC_{50} - und k_{2nd} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

<i>Papain latex</i>			
Assaymethode	Verdünnungsassay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	230 μ L
Enzym	<i>Papain latex</i> (21.11 U/mg)	0.2 μ M	30 μ L
Substrat	Pyr-Phe-Leu-pNA, $K_m(PL)$: 0.42 mM	0.6 mM	30 μ L
Temperatur	25 °C		
Detektion	$\lambda = 410$ nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Alken-Peptide	<i>E64c-like</i> -Asp (541); <i>CA028-like</i> -Asp (557)	0.1 - 30 μ M	10 μ L
Diol-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Leu (559); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Phg (588)	50 nM - 330 μ M	10 μ L
Epoxy-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Phg (610); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Ala (617)	10 nM - 30 μ M	10 μ L
Volumina	230 μ L [P], 30 μ L [E], 30 μ L [S], 10 μ L [I]		

[P] = Puffer, [E] = Enzym, [S] = Substrat, [I] = Inhibitor.

Tabelle 13: IC_{50} - und k_{2nd} -Werte ausgewählter *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide gegen *Papain latex*. Rot unterlegt sind die IC_{50} - und k_{2nd} -Werte der aktivsten Verbindung. Gelblich unterlegt sind die IC_{50} -Werte der reversiblen *E64c*- bzw. *CA028-like*-Diol-Tripeptide.

Verb.	p.H. [%] bei [I] = 30 μ M	IC_{50} [μ M] 5 min*	IC_{50} [μ M] 20 min*	IC_{50} [μ M] 30 min*	k_{2nd} [$M^{-1} s^{-1}$]	k_i/K_i [s^{-1}] / [μ M]
559^[a]	83	26 \pm 2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
588^[a]	88	12 \pm 0.5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
541	81	30 \pm 6	31	25	433 \pm 43	0.0023 / 5.3
557	77	35 \pm 4	40	28	192 \pm 11	0.0016 / 8.3
610	99	2 \pm 1	1 \pm 0.5	0.5 \pm 0.01	56756 \pm 1150	0.036 / 0.16
617	99	18 \pm 2	16 \pm 1	15 \pm 2	1840 \pm 230	0.030 / 16.3
CA074	95.6	14 \pm 1	6 \pm 0.4	1.5 \pm 0.6	30000 ^[b]	n.b.
<i>E-64c</i>	98.7	2.2 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	32500 ^[c]	n.b.
<i>E-64</i>	99.1	0.017 \pm 0.001	0.008 \pm 0.001	0.008 \pm 0.001	374000 ^[b]	n.b.

n.b. = nicht bestimmt; * Inkubation von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe; [a] keine zeitabhängige Hemmung beobachtet

Referenz-Literatur: [b]¹³; [c]⁹⁶.

4.3.2.1.1 Diskussion der ermittelten IC_{50} - und k_{2nd} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide gegen *Papain latex*

Bei Betrachtung der IC_{50} -Werte (Tabelle 13) von *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Leu-OtBu (**559**) und *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) ist ersichtlich, dass sich zwar die IC_{50} -Werte von **559** und **588** unterscheiden, eine eindeutige Abhängigkeit der Aktivität hinsichtlich eines bestimmten Dipeptid-Motivs, *CA028-like*- bzw. *E64c-like*- oder einer Seitenketten (Diol-, „Warhead“) ist aber nicht zu ersehen. Eine zeitabhängige Inhibition konnte für die beiden Verbindungen *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Leu-OtBu (**559**) oder *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) nicht beobachtet werden, was auf eine reversible Hemmung der Protease hindeutet. Für die *E64c*- und *CA028-like*-Diol-Peptide ist eine kovalente Bindung zum Enzym aufgrund des Diol-, „Warheads“ eher unwahrscheinlich, möglicherweise fungiert das Diol-Motiv als Übergangs-Zustands-Analogon und verhindert so die Bindung des eigentlichen Substrats. Im direkten Vergleich des *E64c*- und *CA028-like*-Diol-Peptids fallen jedoch zwei Aspekte auf, zum einen trägt der Diol-, „Warhead“ von *E64c-like*-(*S,S*)-Leu-OtBu (**559**) einen aliphatischen Substituenten (Seitenkette), wohingegen das *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) eine aromatische Seitenkette trägt, zudem handelt es sich bei **559** um ein (*S,S*)-konfiguriertes Diol während **588** (*R,R*)-konfiguriert vorliegt. Beide Diol-Tripeptide liegen mit IC_{50} -Werten von 26 \pm 2 μ M (**559**) und 12 \pm 0.5 μ M (**588**) im mikromolaren Bereich und gehören daher wahrscheinlich nicht zu den potentesten irreversiblen Inhibitoren wie z.B. das im nanomolaren Bereich aktive Leupeptin (Aldehyd-, „Warhead“), jedoch gibt es für diese neue

Verbindungsklasse der *E64c*- und *CA028-like*-Diol-Peptide noch keine vergleichbaren Daten, so dass einer weiterführenden Charakterisierung dieser Verbindungen an diversen Proteasen bedarf. Die IC_{50} -Werte ($>30 \mu M$) als auch die Hemmkonstanten der beiden (*E*)-Alken-Tripeptide, *E64c-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH (**541**) und *CA028-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH (**557**) sind im Vergleich zu den anderen Verbindungen gegen *Papain latex* eher unauffällig (Tabelle 13). Die kleinen k_i -Werte von **541** ($0.023 s^{-1}$) und **557** ($0.016 s^{-1}$) deuten auf eine verlangsamte Reaktion mit *Papain latex* hin (s. Abschnitt 4.3.2). Vergleicht man dazu die K_i -Werte von **541** ($5.3 \mu M$) und **557** ($8.3 \mu M$) miteinander wird deutlich, dass das *CA028-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH (**557**) aufgrund seines größeren K_i -Werts eine verringerte Affinität zum Enzym aufweist, als das *E64c-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH (**541**). Unter Berücksichtigung der beiden Konstanten (k_i und K_i) resultiert daher für **557** ($k_{2nd} = 192 \pm 11 M^{-1} s^{-1}$) ein deutlich kleinerer k_{2nd} -Wert als für **541** ($k_{2nd} = 433 \pm 43 M^{-1} s^{-1}$).

Das *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phg-OH- (**610**) und *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH-Peptid (**617**) weisen ähnliche, und im Vergleich zu den (*E*)-Alken-Peptiden (**541** und **557**) deutlich größere k_i -Werte auf, was für eine schnelle Reaktion mit dem Enzym sprechen würde (Tabelle 13). Hinsichtlich der Affinität (K_i) unterscheiden sich die beiden Epoxy-Peptide jedoch signifikant (100-fache), was sich in den erhaltenen k_{2nd} -Werten von **610** ($k_{2nd} = 56756 \pm 1150 M^{-1} s^{-1}$) und **617** ($k_{2nd} = 1840 \pm 230 M^{-1} s^{-1}$) noch stärker widerspiegelt. Das *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phg-OH-Peptid (**610**) weist wahrscheinlich aufgrund der Bevorzugung der (*S,S*)-Konfiguration des Epoxids in Verbindung mit dem *E64c-like*-Dipeptid gegen *Papain latex* eine größere Affinität als das *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH-Peptid (**617**) auf.

Die Bindungstasche der S1-Seite von Papain ist aus den Aminosäureseitenketten von Ser²¹, Cys²², Gly²³, und einer Schleife der Hauptstrangatomene von Cys⁶³, Asn⁶⁴, Gly⁶⁵ aufgebaut. Beide Schleifen sind über die Disulfidbrücke Cys²²-Cys⁶³ miteinander verbunden. Während der Interaktion des Inhibitors mit dem aktiven Zentrum sind die Substituenten an P1 (Seitenkette des „Warheads“) in Richtung der Oberfläche von S1, entgegen des aktiven Zentrums in Richtung des Lösungsmittels gerichtet. In der Regel werden basische Funktionalitäten bevorzugt akzeptiert, was möglicherweise mit elektrostatischen Wechselwirkungen der Carbonylgruppen von Ser²¹ und Cys⁶³ in Verbindung steht. Für einen Großteil der synthetischen Substrate fand man, dass sowohl aliphatische, als auch aromatische Reste in der S1-Seite sehr gut akzeptiert werden. Möglich wäre daher auch, unter Verzerrung der Bindungsgeometrie von **610** eine Interaktion des aromatischen Restes (Seitenkette Epoxid) mit der S1'-Seite, die hauptsächlich hydrophobe Seitenketten wie Phe, Leu, und Val bevorzugt akzeptiert. Daher kann hinsichtlich des Beitrags des aromatischen Substituenten von *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phg-OH (**610**) in Bezug auf dessen Orientierung im aktiven Zentrum von *Papain latex* keine näheren Aussagen gemacht werden. Der kleine K_i -Wert ($K_i = 0.16 \mu M$) von **610** zeigt eine deutlich gesteigerte Affinität des Inhibitors zum

Enzym an, ein erstes Indiz für eine spezifische Wechselwirkung. Eine erste Bestätigung dieser Hypothesen könnte mittels weiterführender Docking-Experimenten erfolgen. Interessant bleibt auch die Aufklärung des noch unbestätigten Mechanismus der Inaktivierung mittels der *E64c-like*- und *CA028-like*-Diol-Peptide **559** und **588**, als auch die Präferenz einer bestimmten Konfiguration der Diol-Motive, (*S,S*) oder (*R,R*). In Abhängigkeit zu den verwendeten Dipeptid-Motiven (*E64c*- und *CA028-like*) konnte für die getesteten Verbindungen eindeutig ein favorisieren der (*R,R*)-Konfiguration für die *CA028-like*-Diol-Peptide und (*S,S*)-Konfiguration für die *E64c-like*-Diol-Peptide nachgewiesen werden. Interessanterweise scheint eine freie Carboxyfunktion im Fall von *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Leu-OtBu (**559**) nicht entscheidend für die Aktivität der Verbindung zu sein, jedoch ist das Vorhandensein einer freien Carboxyfunktion für *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) von entscheidender Bedeutung, was auf eine entgegengesetzte Orientierung der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Diol-Peptide im aktiven Zentrum hindeutet.

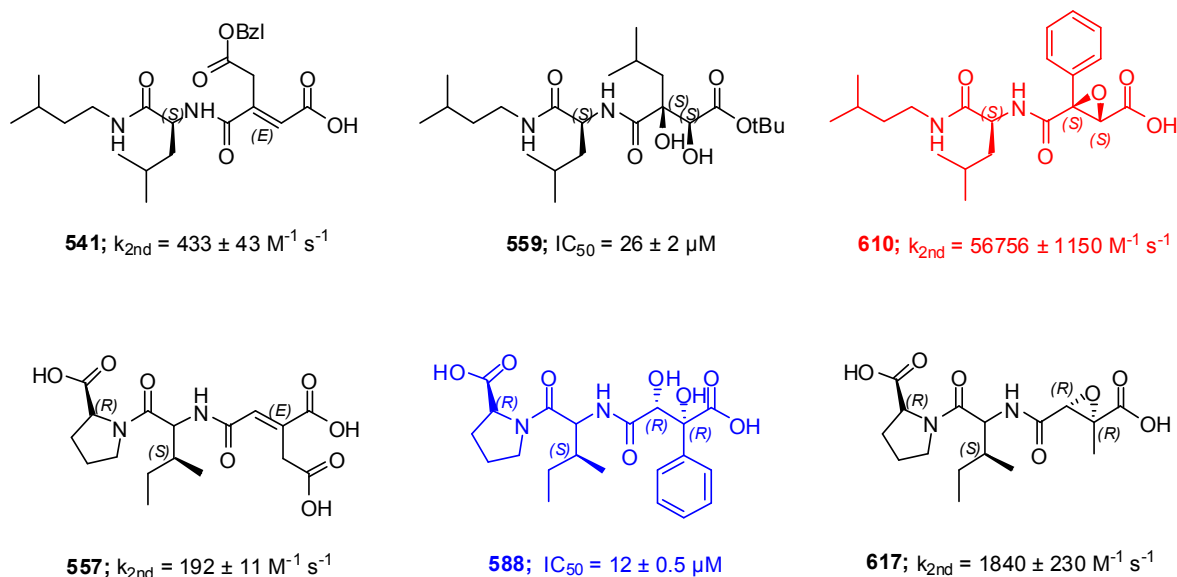


Abbildung 151: Übersicht der gegen *Papain latex* getesteten *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Alken-, Diol- und Epoxy-Peptide, und deren k_{2nd} - und IC_{50} -Werte. Die aktivsten Verbindungen wurden farblich hervorgehoben; das *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH-Peptid (**588**) in blau, und das *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phg-OH-Peptid (**610**) in rot.

Die getesteten *E64c*- und *CA028-like*-(*E*)-Alken-Tripeptide weisen ein deutlich reduziertes inhibitorisches Potential im direkten Vergleich zu den getesteten *E64c*- und *CA028-like*-Epoxy-Peptiden auf (s. Abbildung 151). Auch die großen K_i -Werte der Alken-Peptide (**541** und **557**) sprechen für eine verminderte Affinität zum Enzym. Auf Grundlage der Daten aus den Vorversuchen mit *CA028-like*-(*Z*)-Alken-Peptiden (nicht gezeigt) und den während dieser Arbeit erhaltenen, scheint die *trans*- bzw. (*E*)-Konfiguration entscheidend für die gerichtete-

Orientierung der Alken-Peptide im katalytischen Spalt der Protease und dem daraus resultierenden nucleophilen Angriff des Thiolats.

4.3.2.2 Bestimmung der IC_{50} -Werte und Hemmkonstanten ausgewählter *E64c-like*- und *CA028-like*-Tripeptide gegen *Papain carica*

Tabelle 14: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des Verdünnungsassays gegen *Papain carica* für die Bestimmung der IC_{50} - und k_{2nd} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

<i>Papain carica</i>			
Assaymethode	Verdünnungsassay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	230 μ L
Enzym	<i>Papain carica</i> (3.11 U/mg)	1.0 μ M	30 μ L
Substrat	Pyr-Phe-Leu-pNA, K_m (PC): 0.38 mM	0.6 mM	30 μ L
Temperatur	25 °C		
Detektion	λ = 410 nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Alken-Peptide	<i>E64c-like</i> -Asp (541); <i>CA028-like</i> -Asp (557)	0.1 - 30 μ M	10 μ L
Diol-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Leu (567); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Phg (588)	50 nM - 330 μ M	10 μ L
Epoxy-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Fluor-Ala (612); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Ala (617)	10 nM - 30 μ M	10 μ L
Volumina	230 μ L [P], 30 μ L [E], 30 μ L [S], 10 μ L [I]		

[P] = Puffer, [E] = Enzym, [S] = Substrat, [I] = Inhibitor.

Tabelle 15: IC_{50} - und k_{2nd} -Werte ausgewählter *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptiden gegen *Papain carica*. Rot unterlegt sind die IC_{50} - und k_{2nd} -Werte der aktivsten Verbindung. Gelblich unterlegt sind die IC_{50} -Werte der reversiblen *E64c*- bzw. *CA028-like*-Diol-Tripeptide.

Verb.	p.H. [%] bei [I] = 30 μ M	IC_{50} [μ M] 5 min*	IC_{50} [μ M] 20 min*	IC_{50} [μ M] 30 min*	k_{2nd} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_i/K_i [s ⁻¹] / [μ M]
567^[a]	84	8 \pm 2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
588^[a]	74	12 \pm 3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
541	74	28 \pm 4	23 \pm 1	24 \pm 0.5	278 \pm 21	0.0017 / 6.1
557	74	34 \pm 0.5	33 \pm 2	30 \pm	164 \pm 9	n.b.
612	99	0.8 \pm 0.5	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	950000 \pm 1150	0.076 / 0.08
617	99	17 \pm 4	14 \pm 1	11 \pm 0.5	13750 \pm 521	0.033 / 0.24
CA074	97.1	15 \pm 1	8 \pm 0.5	7 \pm 1	30000 ^[b]	n.b.
E-64d	98.3	12.5 \pm 1	6.5 \pm 1	6.0 \pm 1	32500 ^[c]	n.b.
E-64	99.9	0.006 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	374000 ^[b]	n.b.

n.b. = nicht bestimmt; * Inkubation von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe; [a] keine zeitabhängige Hemmung beobachtet; Referenz-Literatur: [b]¹³; [c]⁹⁶.

4.3.2.2.1 Diskussion der ermittelten IC_{50} - und k_{2nd} -Werte der E64c- und CA028-like-Tripeptide gegen *Papain carica*

Aufgrund der ähnlichen Screening-Daten von *Papain latex* und *carica* hätte man auch reproduzierbare Ergebnisse für die erhaltenen Hemmkonstanten erwartet. Vergleicht man die erhaltenen IC_{50} - und k_{2nd} -Werte der beiden *Papaine* (*latex* und *carica*) für die E64c-like- und CA028-like-Diol- und -Alken-Peptide miteinander trifft diese Annahme auch Größtenteils zu. Für die beiden E64c-like-(S,S)-Diol-Peptide, das (S,S)-Diol-Leu-OtBu (**559**) und (S,S)-Diol-Leu-OH (**567**), sowie dem CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH (**588**) wurden für *Papain latex* und *carica* vergleichbare Hemmwerte erhalten, wobei die IC_{50} -Werte für *Papain carica* etwas unter den für *Papain latex* bestimmten Werten lagen. Gegen *Papain carica* kam es jedoch für das carboxyterminal-entschützte E64c-like-(S,S)-Diol-Leu-OH-Peptid (**567**) mit einem IC_{50} -Wert von $8 \pm 2 \mu\text{M}$ zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung, so dass nicht wie zuvor gegen *Papain latex* das CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH-Peptid (**588**) das aktivste Diol-Tripeptid war, sondern **567**. Für das CA028-like-(R,R)-Diol-Phg-OH-Peptid (**588**) wurde der gleiche IC_{50} -Wert (**588**; $IC_{50} = 12 \pm 3 \mu\text{M}$) wie gegen *Papain latex* bestimmt. Eine zeitabhängige Inhibition wurde für keines der E64c- bzw. CA028-like-Diol-Peptide gegen *Papain carica* beobachtet. Die Hemmdaten von *Papain latex* gegen das E64c-like-(E)-Alken-Asp-OH- (**541**) und CA028-like-(E)-Alken-Asp-OH-Peptid (**557**) wurden für *Papain carica* reproduziert wiedergegeben, und waren wie auch schon zuvor hinsichtlich ihrer IC_{50} - und k_{2nd} -Werte eher unauffällig (s. Tabelle 15).

Beim direkten Vergleich der erhaltenen Hemmwerte der E64c-like- und CA028-like-Epoxy-Peptide gegen *Papain latex* kommt es jedoch zu einer größeren Diskrepanz hinsichtlich der für *Papain carica* bestimmten Werte. Zwar ist sowohl gegen *Papain latex* als auch *Papain carica* ein E64c-like-Epoxy-Peptid der aktivste Inhibitor mit einem enormen k_{2nd} -Wert, jedoch handelt es gegen *Papain carica* um das fluorsubstituierte E64c-like-(rac)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH-Peptid (**612**) und nicht wie gegen *Papain latex* um das phenylsubstituierte E64c-like-Epoxy-Peptid (**610**). Der für E64c-like-(rac)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**) gegen *Papain carica* bestimmte k_{2nd} -Wert ($k_{2nd} = 950000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) war deutlich größer als der für **610** ($k_{2nd} = 56756 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gegen *Papain latex* erhaltene k_{2nd} -Wert. Für das CA028-like-(R,R)-Epoxy-Alanin-OH-Peptid (**617**) wurden ähnliche IC_{50} - und k_i -Werte ($IC_{50} = 17 \pm 4 \mu\text{M}$; $k_i = 0.033 \text{ s}^{-1}$) wie gegen *Papain latex* erhalten. Bezüglich des K_i -Werts von **617** unterscheidet sich der für *Papain carica* ($K_i = 0.24 \mu\text{M}$) bestimmte Wert jedoch deutlich von dem für *Papain latex* ($K_i = 16.3 \mu\text{M}$) erhaltenen K_i -Werts, aufgrund dessen es zu einer signifikanten Steigerung des k_{2nd} -Werts für **617** ($k_{2nd} = 13750 \pm 521 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gegen *Papain carica* kam. Vergleicht man die K_i - und k_i -Werte der E64c-like- und CA028-like-Epoxy-Peptide so fällt auf, dass das CA028-like-(R,R)-Epoxy-Alanin-OH (**617**) aufgrund verminderten k_i -Werts ($k_i = 0.033 \text{ s}^{-1}$) zwar langsamer

als *E64c-like-(rac)*-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**; $k_i = 0.076 \text{ s}^{-1}$) mit die der Protease reagiert, jedoch durch den um ein Vielfaches größeren K_i -Wert von **617** ($K_i = 0.24 \text{ }\mu\text{M}$) im Vergleich zu **612** ($K_i = 0.08 \text{ }\mu\text{M}$) eine deutlich geringere Affinität zur Protease aufweist, und in Folge dessen *E64c-like-(rac)*-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**617**) mit einem k_{2nd} -Wert von $k_{2nd} = 950000 \pm 1150 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ das aktivste Epoxy-Peptid gegen *Papain carica* darstellt. Die möglichen Ursachen für die Diskrepanzen der für die *E64c-like*-Epoxy-Peptide erhaltenen Hemmdaten gegen *Papain carica* und *Papain latex* sind zum jetzigen Zeitpunkt unklar, da sich die S1-Tasche von *Papain latex* und *carica* prinzipiell nicht unterscheiden sollten. Erste Hinweise über die wahrscheinlichen Orientierungen der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide im aktiven Zentrum von *Papain carica* liefern möglicherweise Docking-Experimente ausgewählter Verbindungen (s. Abbildung 152).

Für die signifikante Aktivität von *E64c-like-(rac)*-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**) spricht auch der direkte Vergleich der k_{2nd} -Werte von **612** ($k_{2nd} = 950000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) mit dem Referenzinhibitor, E-64 ($k_{2nd} = 374000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Das weniger aktive *CA028-like*-Epoxy-Peptid **617** lag mit einem k_{2nd} -Wert von $k_{2nd} = 13750 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in einem ähnlichen Bereich wie der vergleichbare Referenzinhibitor, CA074 ($k_{2nd} = 30000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Anhand der in dieser Arbeit getesteten *E64c-like*- und *CA028-like*-Peptide lässt sich für *Papain carica* eine Bevorzugung der *E64c-like*-gegenüber den *CA028-like*-Peptiden ableiten, was sich auch in den Referenz-Werten von E-64 und CA074 widerspiegelt.

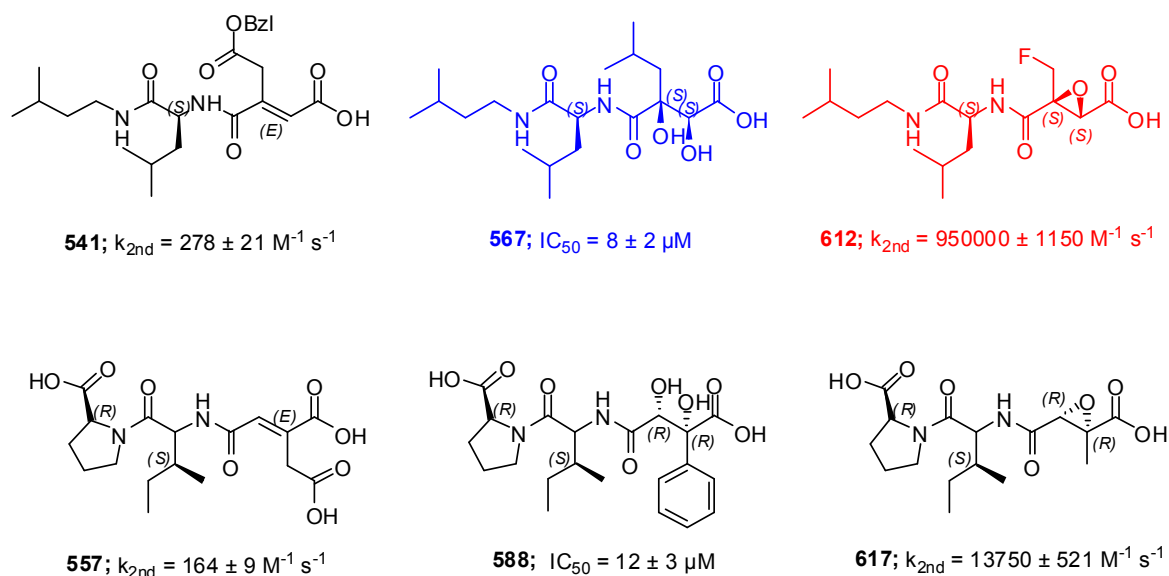


Abbildung 152: Übersicht der gegen *Papain carica* getesteten *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Alken-, Diol- und Epoxy-Peptide, und deren k_{2nd} - und IC_{50} -Werte. Die aktivsten Epoxy- und Diol-Peptide wurden farblich hervorgehoben; *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Leu-OH-Peptid (**567**) in blau, und das *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH-Peptid (**612**) in rot.

4.3.2.3 Bestimmung der IC₅₀-Werte und Hemmkonstanten ausgewählter *E64c-like*- und *CA028-like*-Tripeptide gegen Cathepsin B

Tabelle 16: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des Verdünnungsassays gegen *Cathepsin B* für die Bestimmung der IC₅₀- und k_{2nd} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

<i>Cathepsin B</i>			
Assaymethode	Verdünnungsassay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 6.0	200 mM	230 µL
Enzym	<i>Cathepsin B</i> (Bovine Spleen); 37 U/mg	0.3 µM	30 µL
Substrat	Z-Arg-Arg-pNA, K_m (CB): 0.67 mM	1.0 mM	30 µL
Temperatur	40 °C		
Detektion	λ = 410 nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Alkene-Peptide	<i>E64c-like</i> -Tyr (540); <i>CA028-like</i> -Asp (557)	0.1 - 30 µM	10 µL
Diole-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Phg (568); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Phg (588)	50 nM - 330 µM	10 µL
Epoxy-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Cha (613); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Ala (617)	10 nM - 30 µM	10 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

[P] = Puffer, [E] = Enzym, [S] = Substrat, [I] = Inhibitor.

Tabelle 17: IC₅₀- und k_{2nd} -Werte ausgewählter *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptiden gegen *Cathepsin B*. Rot unterlegt sind die IC₅₀- und k_{2nd} -Werte der aktivsten Verbindung. Gelblich unterlegt sind die IC₅₀-Werte der reversiblen *E64c*- bzw. *CA028-like*-Diol-Tripeptide.

Verb.	p.H. [%] bei [I] = 30 µM	IC ₅₀ [µM] 5 min*	IC ₅₀ [µM] 20 min*	IC ₅₀ [µM] 30 min*	k_{2nd} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_i/K_i [s ⁻¹] / [µM]
568^[a]	99	0.057 ± 0.12	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
588^[a]	92	3.2 ± 1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
540	58	29 ± 3	29 ± 0.5	26 ± 1	1104 ± 102	0.018 / 16.3
557	67	34 ± 2	27 ± 4	22 ± 2	3478 ± 181	0.016 / 4.6
613	94	0.8 ± 0.08	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.04	106250 ± 2370	0.102 / 0.96
617	93	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02	162500 ± 4230	0.078 / 0.48
CA074	99	0.0028 ± 3e ⁻⁴	0.0025 ± 7e ⁻⁴	0.0022 ± 4e ⁻⁴	153000 ^[d]	n.b.
E-64c	97	0.240 ± 0.09	0.230 ± 0.03	0.200 ± 0.04	175000 ^[e]	n.b.
E-64	99	0.014 ± 0.003	0.012 ± 0.01	0.009 ± 0.02	89400 ^[c]	n.b.
DC-11	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	625 ^[b]	n.b.

n.b. = nicht bestimmt; * Inkubation von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe.

[a] keine zeitabhängige Hemmung beobachtet.

Referenz-Literatur: [b]¹³; [c]⁹⁶; [d]³⁸⁰; [e]³⁸¹

4.3.2.3.1 Diskussion der ermittelten IC_{50} - und k_{2nd} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide gegen Cathepsin B

Bei Cathepsin B ist aufgrund der „occluding loop“ die Bindungsoberfläche für P1-Substituenten begrenzt. Die Seitenkette von Glu¹²² ist in Richtung des aktiven Zentrums ausgerichtet, wodurch noch zusätzlich der negative Charakter der Bindungstasche erhöht wird. Dadurch ist die S1-Tasche von CatB im Vergleich zu den übrigen Familienmitgliedern etwas kleiner, und akzeptiert große Substituenten in P1 um ein Vielfaches schlechter als Cathepsin L. Unter diesem Aspekt war es interessant zu sehen, dass es sich bei den aktivsten Verbindungen hauptsächlich um aromatisch- oder raumfüllend-substituierte *E64c*- bzw. *CA028-like*-Peptide handelte. Die bisher unbekannten Diol-Peptide, *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH (**568**) und *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) überraschten durch eine signifikante Hemmung von Cathepsin B. Beide Verbindungen **568** und **588** tragen einen Phenyl-Rest an ihrem Diol-Segment, wobei das *CA028-like*-Diol-Peptid (**588**), (*R,R*)-konfiguriert und das *E64c-like*-Diol-Peptid in (*S,S*)-Konfiguration vorliegen. Bezüglich der unterschiedlichen Bindungs-Modi der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Peptidmotive, und einer gerichteten Wechselwirkung mit den beiden Histidinen, His¹¹⁰ und His¹¹¹ der occluding loop von CatB mit der Carboxyfunktion der *CA028-like*-Peptide hätte man eine Bevorzugung der *CA028-like*-Peptide erwartet. Bei Betrachtung der IC_{50} -Werte der beiden Diol-Peptide, *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH (**568**) und *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**) in Tabelle 17 fällt auf, dass *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH (**568**; IC_{50} = 57 nM) mit einem IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich Cathepsin B deutlich stärker hemmt als das im mikromolaren Bereich aktive *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH-Peptid (**588**, IC_{50} = 3.2 μ M), und somit eine Präferenz hinsichtlich der *E64c-like*-, und nicht wie vermutet der *CA028-like*-Verbindung auftritt. Die Konfiguration der aktiven Diol-Peptide scheint wie zuvor bei der Testierung gegen *Papain carica* und *latex* spezifisch für das jeweilige Peptid-Motiv zu sein. So wurde auch gegen CatB eine gesteigerte Aktivität der Diol-Peptide in der Kombination gefunden, dass das (*S,S*)-Enantiomer der Diol-„Warheads“ in Kombination mit den *E64c-like*- und das (*R,R*)-Enantiomer der Diol-„Warheads“ in Verbindung mit den *CA028-like*-Peptid aktiver ist als die jeweiligen inversen Derivate. Die verminderte Aktivität der invers konfigurierten Peptide hängt wahrscheinlich mit einem additiven Effekt der einzelnen Seitenketten des entsprechenden Peptids (*E64c-like* oder *CA028-like*) zusammen, wobei es nur in Verbindung mit einem bestimmten Enantiomer bzw. Konfiguration (*S,S* bzw. *R,R*) zu einer hochaffinen Wechselwirkung mit der S1-Seite kommt. Die vielversprechenden Ergebnisse des *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH-Peptids (**568**) geben Anlass die Aktivität und das Wirkspektrum der Verbindung in weiterführenden Experimenten näher zu untersuchen. Die spezifische Orientierung von **568** führt möglicherweise zu einer vorteilhaften Positionierung des Diol-

Motivs hin zum Oxyanion-Loch des aktiven Zentrums, wodurch der Zugang des Substrats verhindert wird. Während der Testierung der Diol-Peptide gegen Cathepsin B wurde keine zeitabhängige Hemmung beobachtet.

Die IC_{50} -Werte der *E64c*- und *CA028-like-(E)*-Alken-Peptide liegen im mikromolaren Bereich, vergleichbar mit den gegen *Papain latex* und *carica* bestimmten Werten, wobei sich die k_{2nd} -Werte der Alken-Peptide gegen CatB deutlich von denen für die Papaine bestimmten unterscheiden, was hauptsächlich auf den kleineren k_i -Wert der *E64c*- bzw. *CA028-like-(E)*-Alken-Peptide zurückzuführen ist (Tabelle 17). Sowohl für das *E64c-like-(E)*-Alken-Tyr-OH- (**540**) als auch das *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH-Peptid (**557**) wurde eine starke Zeitabhängigkeit der IC_{50} -Werte beobachtet. Die k_{2nd} -Werte von **540** ($k_{2nd} = 1104 \pm 102 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und **557** ($k_{2nd} = 3478 \pm 181 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gegen Cathepsin B liegen deutlich über denen des Referenz-Inhibitors DC-11 ($k_{2nd} = 625 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), wobei es sich bei dieser Verbindung um ein Analogon des E-64c-Inhibitors handelt, bei dem lediglich die Epoxygruppe durch ein Fumarat ersetzt wurde (s. Abschnitt 2.3.3.3). Unter Berücksichtigung der analogen strukturellen Eigenschaften von DC-11 und dem getesteten *E64c-like-(E)*-Alken-Tyr-OH-Peptid (**540**), welches sich ausschließlich aufgrund des 4-Hydroxy-benzyl-Substituenten von DC-11 unterscheidet, mag die signifikante Aktivitätszunahme von **540** im Vergleich zu DC-11 hauptsächlich auf das Vorhandensein der 4-Hydroxy-benzyl-Seitenkette zurückgeführt werden. Der k_{2nd} -Wert von *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH-Peptid (**557**) übertrifft den für **540** bestimmten k_{2nd} -Wert nochmals um das 3-fache, ein direkter Vergleich des k_{2nd} -Werts von **557** ($k_{2nd} = 3478 \pm 181 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) mit einer Referenzsubstanz wie z.B. **540** und DC-11 ist leider nicht möglich, da bisher noch keine Daten zu einer vergleichbaren Verbindung bekannt sind. Die gesteigerten k_{2nd} -Werte von **540** und **557** gegen Cathepsin B sind auf eine schnellere Alkylierung des Enzyms (k_i) zurückzuführen, da es zu keiner Steigerung der Affinität zur Protease (K_i) im Vergleich zu den gegen die Papaine bestimmten Werten kam.

Für das *E64c-like*- als auch das *CA028-like*-Epoxy-Peptid wurden große k_{2nd} -Werte erhalten. Vergleicht man die gegen Cathepsin B bestimmten k_{2nd} -Werte von *E64c-like-(rac)*-Epoxy-Cha-OH (**613**; $k_{2nd} = 106250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) mit denen des Referenz-Inhibitors E-64c ($k_{2nd} = 175000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) so wird deutlich, dass beide Verbindungen ähnlich starke Aktivitäten aufweisen, der Referenz-Inhibitor aber den k_{2nd} -Wert von **613** übersteigt. Der hauptsächliche Unterschied des *E64c-like*-Epoxy-Cha-Peptids (**613**) im Vergleich zu E-64c liegt in der raumfüllenden, flexiblen Cyclohexylseitenkette begründet, welche möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Positionierung des Peptids im aktiven Zentrum der Protease ausübt, oder es kommt zu einer inversen Orientierung des Epoxy-Peptids (**613**) im Fall einer Interaktion der Cyclohexylseitenkette mit $S1'$ -Seite des Enzyms. Das Dipeptid-Motiv (*E64c*- bzw. *CA028-like*) übt im Fall von Cathepsin B augenscheinlich einen größeren Einfluss auf die Aktivitäten der Epoxy-Tripeptide aus, als für die Papaine. Das Pro-Ile-Motiv von *CA028-like-(R,R)*-

Epoxy-Ala-OH (**617**) führt wahrscheinlich zu einer sogartigen Positionierung des Peptids und im speziellen des Prolins von **617** in der S2'-Tasche von CatB, wobei es zur Bildung von Wasserstoffbückenbindungen zwischen den Histidinen (His¹¹⁰, His¹¹¹) der „occluding loop“ von CatB und der Carboxygruppe des Prolins von **617** kommt. Durch die vorgegebene Orientierung aufgrund der spezifischen Wechselwirkung des Prolins von **617** werden vermutlich auch die restlichen Interaktionen des Tripeptids induziert. Die für CA028-like-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**) bestimmten Hemmkonstanten (Tabelle 17) sind mit den Werten des Referenz-Inhibitors, CA074 vergleichbar. Der direkte Vergleich der IC₅₀-Werte spricht zwar eindeutig für eine größere Aktivität des Referenz-Inhibitors (CA074), wobei der k_{2nd}-Wert von **617** (k_{2nd} = 162500 M⁻¹ s⁻¹), wenn auch geringfügig, aber doch über dem von CA074 (k_{2nd} = 153000 M⁻¹ s⁻¹) liegt. Da der k_{2nd}-Wert für die Bewertung des inhibitorischen Potentials eines irreversiblen Inhibitors von größerer Bedeutung ist, als der IC₅₀-Wert kann für **617** eine vergleichbare Hemmung angenommen werden wie für CA074. Fraglich ist ob, oder in wie weit die Methylgruppe (Epoxy-Seitenkette) von **617** einen Einfluss auf die Aktivität bzw. Interaktion mit der S1-Seite von CatB ausübt, da wie schon erwähnt die IC₅₀- und k_{2nd}-Werte für **617** und CA074 fast identisch sind. Der erwähnenswerte IC₅₀- und k_{2nd}-Wert von **617** (IC₅₀ = 57 nM; k_{2nd} = 162500 M⁻¹ s⁻¹) geben Anlass das Potential der Verbindung in weiterführenden Experimenten gegen ein breiteres Spektrum papainähnlicher Cysteinproteasen zu untersuchen.

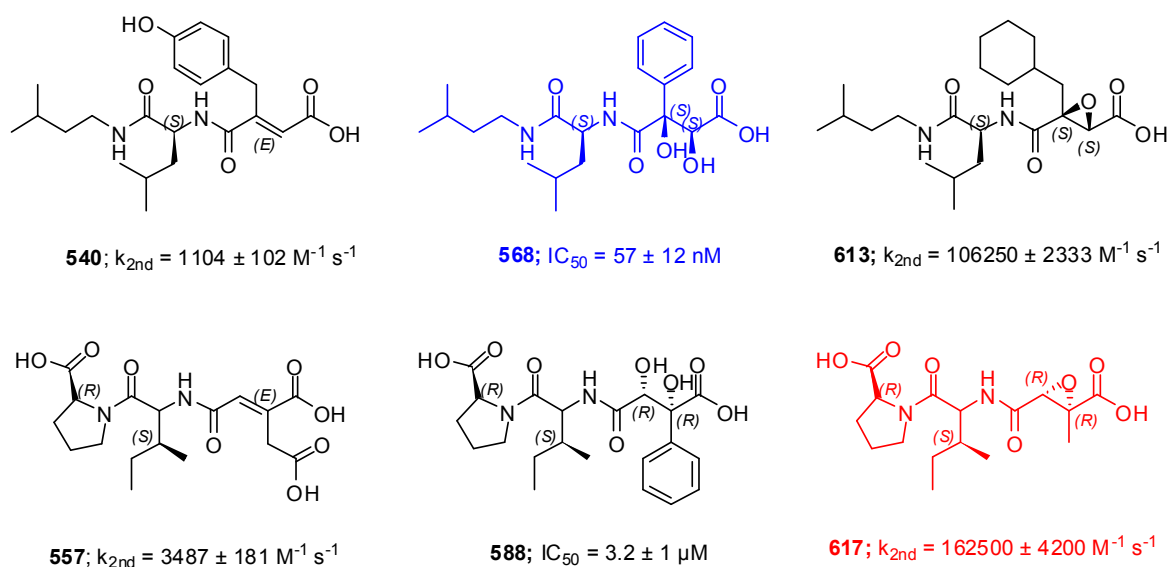


Abbildung 153: Übersicht der gegen *Cathepsin B* getesteten *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Alken-, Diol- und Epoxy-Peptide, und deren k_{2nd}- und IC₅₀-Werte. Die aktivsten Verbindungen wurden farblich hervorgehoben; das *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH-Peptid (**568**) in blau, und das *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH-Peptid (**617**) in rot.

4.3.2.4 Bestimmung der IC₅₀-Werte und Hemmkonstanten gegen Cathepsin L

Tabelle 18: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des Verdünnungsassays gegen *Cathepsin L* für die Bestimmung der IC₅₀- und k_{2nd} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

<i>Cathepsin L</i>			
Assaymethode	Verdünnungsassay	Konzentration	Volumen
Puffer	NaCH ₃ COO ⁻ (340 mM), CH ₃ COOH (60 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 5.5	400 mM	230 µL
Enzym	<i>Cathepsin L (Human liver)</i> (6.354 mU/mg)	0.2 µM	30 µL
Substrat	Z-Phe-Arg-pNA, K_m (CL): 0.19 mM	0.5 mM	30 µL
Temperatur	30 °C		
Detektion	λ = 410 nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Alkene-Peptide	<i>E64c-like</i> -Phg (537); <i>CA028-like</i> -Asp (557)	0.1 - 30 µM	10 µL
Diole-Peptide	<i>E64c-like</i> -(<i>R,R</i>)-Leu (571); <i>E64c-like</i> -(<i>S,S</i>)-Phg (568)	50 nM - 330 µM	10 µL
Epoxy-Peptide	<i>E64c-like</i> -(<i>S,S</i>)-Cha (612); <i>CA028-like</i> -(<i>R,R</i>)-Ala (617)	10 nM - 30 µM	10 µL
Volumina	230 µL [P], 30 µL [E], 30 µL [S], 10 µL [I]		

[P] = Puffer, [E] = Enzym, [S] = Substrat, [I] = Inhibitor.

Tabelle 19: IC₅₀- und k_{2nd} -Werte ausgewählter *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide gegen *Cathepsin L*. Rot unterlegt sind die IC₅₀- und k_{2nd} -Werte der aktivsten Verbindung. Gelblich unterlegt sind die IC₅₀-Werte der reversiblen *E64c*- bzw. *CA028-like*-Diol-Tripeptide.

Verb.	p.H. [%] bei [I] = 30 µM	IC ₅₀ [µM] 5 min*	IC ₅₀ [µM] 20 min*	IC ₅₀ [µM] 30 min*	k_{2nd} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_i/K_i [s ⁻¹] / [µM]
571^[a]	67	19 ± 3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
568^[a]	40	47 ± 7	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
537	53	40 ± 4	29 ± 4	21 ± 1	1398 ± 143	0.023 / 19.3
557^[x]	57	36 ± 2	35 ± 5	37 ± 3	n.b.	n.b.
612	88	1.7 ± 0.3	0.8 ± 0.5	0.6 ± 0.2	658333 ± 3940	0.079 / 0.12
617	97	25.5 ± 1	20 ± 2	19 ± 1	42857 ± 1850	0.042 / 0.98
<i>CA074</i>	99	172 ± 7	153 ± 7	128 ± 9	269 ^[b]	n.b.
<i>E-64c</i>	97	0.16 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	206000 ^[d]	n.b.
<i>E-64</i>	99	0.089 ± 0.003	0.068 ± 0.007	0.051 ± 0.002	96250 ^[c]	n.b.
<i>DC-11</i>	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2272 ^[c]	n.b.

n.b. = nicht bestimmt; * Inkubation von Enzym und Inhibitor vor Substratzugabe.

[a] keine zeitabhängige Hemmung beobachtet

Referenz-Literatur: [b]¹³; [c]⁹⁶; [d]³⁸⁰

[x] unspezifische Hemmung vermutet.

4.3.2.4.1 Diskussion der ermittelten IC_{50} - und k_{2nd} -Werte ausgewählter *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide gegen Cathepsin L

Die Aktivität der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Diol-Peptide nahm im Vergleich zu den Hemmwerten von CatB deutlich gegenüber Cathepsin L ab. Von einer weiterführenden Charakterisierung der *CA028-like*-Diol-Peptide wurde schon nach dem ersten Screening abgesehen, so dass ausschließlich für die *E64c-like*-Diol-Peptide **568** und **571** die IC_{50} -Werte bestimmt wurden (Tabelle 19). Die erhaltenen IC_{50} -Werte von **571** ($IC_{50} = 19 \pm 3 \mu M$) und **568** ($IC_{50} = 47 \pm 7 \mu M$) spiegeln jedoch größtenteils die Ergebnisse des vorhergehenden Screenings wieder. Auffällig ist jedoch, dass es sich bei den *E64c-like*-Diol-Peptiden um ein (S,S)- (**568**) bzw. (R,R)-konfiguriertes Tripeptid (**571**) handelt. Möglicherweise spielt die Stereoinformation (S,S oder R,R) der Diol-Peptide bezüglich der affinen oder selektiven Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum von CatL eine untergeordnete Rolle da beide Enantiomere eine ähnliche Aktivität aufweisen, oder sie steht in direktem Zusammenhang mit der jeweiligen Seitenkette des Diol-Peptids, da sich die Seitenketten von **571** und **568** deutlich unterscheiden. Derzeit sind dies aber nur Spekulationen, da jede neue oder zusätzliche Gruppe eine veränderte Orientierung des Peptids innerhalb des aktiven Zentrums der Protease zu Folge hat. Die Hemmung von Cathepsin L durch die *E64c-like*-Diol-Peptide war wie auch schon für die zuvor getesteten Proteasen nicht zeitabhängig. Die (E)-Alken-Tripeptide wiesen deutlich die schwächsten Hemmung gegen Cathepsin L auf, wobei speziell für *CA028-like*-Alken-Asp-OH (**557**) keine zeitabhängige Hemmung von CatL über einen Zeitraum von 30 min beobachtet wurde, was für eine unspezifische Hemmung der Protease spricht. Unter diesem Hintergrund wurden ausschließlich für das *E64c-like*-(E)-Alken-Phg-OH-Peptid (**537**) die Hemmkonstanten bestimmt. Für **537** ($IC_{50} = 40 \pm 4 \mu M$) wurde gegen CatL eine starke Zeitabhängigkeit der IC_{50} -Werte beobachtet (Tabelle 19). Der k_{2nd} -Wert von **537** ($k_{2nd} = 1104 \pm 102 M^{-1} s^{-1}$) liegt etwas unter dem des Referenz-Inhibitors DC-11 ($k_{2nd} = 2272 M^{-1} s^{-1}$), der gegenüber CatL deutlich aktiver ist als noch gegen CatB. Unter Berücksichtigung der analogen strukturellen Eigenschaften von DC-11 und dem getesteten *E64c-like*-(E)-Alken-Phg-OH-Peptid (**537**), welches sich ausschließlich bezüglich der Phenylseitenkette von DC-11 unterscheidet, ist diese möglicherweise für den kleineren k_{2nd} -Wert von **537** im Vergleich zu DC-11, und infolge dessen für die verminderte Aktivität verantwortlich. Der k_i -Wert von **537** ($k_i = 0.023 s^{-1}$) hat im Vergleich zu den k_i -Werten der zuvor getesteten *E64c-like*-Alken-Peptiden gegen *Papain latex* und *carica* (s. Abschnitt) signifikant zugenommen, was für eine schnellere Alkylierung der Protease spricht. Unter Berücksichtigung der erhalten Hemmdaten scheinen die *E64c*- und *CA028-like*-(E)-Alken-Peptide generell eher ungeeignet für eine effiziente und selektive Inhibierung von Cathepsin L zu sein.

Auch gegen Cathepsin L waren die *E64c*- bzw. *CA028-like*-Epoxy-Tripeptide die Aktivsten Verbindungen, wobei das *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH- (**617**) CatL um ein Vielfaches schwächer als das *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH-Peptid (**612**) hemmt. Cathepsin L besitzt im Vergleich zu Cathepsin B eine größere S1-Bindungsoberfläche, und ist daher in der Lage voluminösere P1-Reste des Peptids zu beherbergen. Eine „occluding loop“ besitzt CatL jedoch nicht, so dass es auch nicht zu den spezifischen Wechselwirkungen der Carboxygruppe des Prolins von **617** mit den Histidinen (His¹¹⁰ und His¹¹¹) kommen kann. Die S2'-Bindungstasche von CatL akzeptiert vorwiegend kleine Seitenketten (Ala, Val, Leu), so dass dieser Umstand wahrscheinlich für die stark reduzierte Aktivität von **617** gegenüber CatL verantwortlich ist und daher indirekt zu einer Bevorzugung des *E64c-like*-Epoxy-Peptids (**612**) führt. Die IC₅₀- und k_{2nd}-Werte der Epoxy-Peptide **612** und **617** in Tabelle 19 zeigen, dass zwar für beide Epoxy-Peptide ähnliche k_i-Werte für **612** (k_i = 0.079 s⁻¹) und **617** (k_i = 0.042 s⁻¹) bestimmt wurden, jedoch **612** (K_i = 0.12 μ M) aufgrund seines wesentlich kleineren K_i-Werts im Vergleich zu **617** (K_i = 0.98 μ M) eine größere Affinität zu CatL aufweist, und dadurch die Protease effizienter hemmt, was sich in den k_{2nd}-Werten der beiden Epoxy-Peptide widerspiegelt (Tabelle 19).

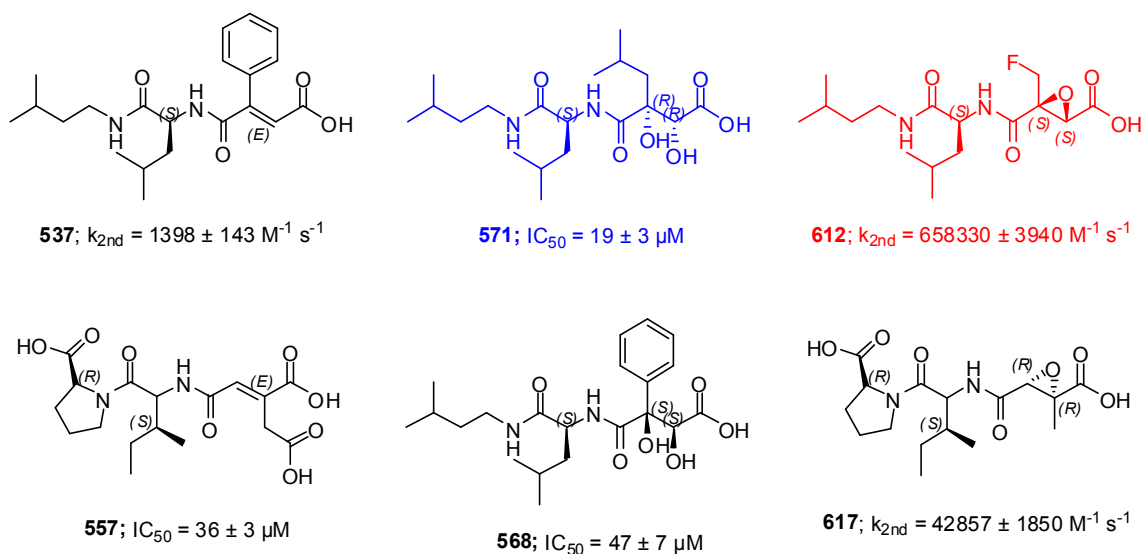


Abbildung 154: Übersicht der gegen *Cathepsin L* getesteten *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Alken-, Diol- und Epoxy-Peptide, und deren k_{2nd}- und IC₅₀-Werte. Die aktivsten Verbindungen wurden farblich hervorgehoben; das *E64c-like*-(*R,R*)-Diol-Leu-OH-Peptid (**571**) in blau, und das *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH-Peptid (**612**) in rot.

Vergleicht man die k_{2nd}-Werte der Epoxy-Tripeptide **612** (k_{2nd} = 658333 ± 3940 M⁻¹ s⁻¹) und **617** (k_{2nd} = 42857 ± 1850 M⁻¹ s⁻¹) mit denen der Referenz-Inhibitoren E-64c (k_{2nd} = 206000 M⁻¹ s⁻¹) bzw. CA074 (k_{2nd} = 269 M⁻¹ s⁻¹) erkennt man, dass **617** eine viel größere Aktivität als

CA074 gegen CatL aufweist, im Vergleich zu **612** aber zu vernachlässigen ist. Selbst der hochaktive Referenz-Inhibitor, E-64c kommt nicht an die für *E64c-like-(rac)*-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**) bestimmten k_{2nd} -Werte heran. Der Einfluss des Fluors (Seitenkette) von **612** auf die Orientierung des Epoxy-Peptids innerhalb des aktiven Zentrums, sowie der Wechselwirkungen mit S1-Seite von CatL sind derzeit noch unklar. Der $-I$ -Effekt des Fluoratoms ist möglicherweise für die gesteigerte Reaktivität bzw. Erhöhung des elektrophilen Charakters der Verbindung verantwortlich. Da es sich bei **612** um eine racemische Verbindung handelt, kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage hinsichtlich der bevorzugten Konfiguration, (*S,S*) oder (*R,R*) des *E64c-like*-Epoxy-Peptids (**612**) gemacht werden, da sowohl das (*R,R*)- als auch (*S,S*)-Enantiomer für die Aktivität verantwortlich sein können, oder keine Abhängigkeit der Aktivität bezüglich der Stereoinformation auftritt. Die großen k_{2nd} -Werte von **612** geben aber Anlass das Potential dieser Verbindung in umfassenderen Studien gegen ein größeres Spektrum papainähnlicher Cysteinproteasen zu untersuchen.

4.3.3 Strukturwirkungsbeziehung der getesteten *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide

Im folgenden Abschnitt soll anhand der ermittelten Hemmdaten der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide die Inhibition der papainähnlichen Cysteinproteasen (Papain, CatB und CatL) systematisch und unter Berücksichtigung bestimmter Kriterien analysiert werden. Dafür wird der Einfluss der Stereochemie, der Substituenten (Seitenketten) am elektrophilen System (Alken, Diol, Epoxid) in Verbindung mit dem jeweiligen Dipeptid-Motiv (*E64c-like* oder *CA028-like*) auf die Hemmung der untersuchten Cysteinproteasen betrachtet. Die Selektivität der einzelnen Verbindungen innerhalb der verwendeten Proteasen wird zusätzlich näher besprochen. Desweiteren werden die Hemmeigenschaften der verschiedenen „Warheads“, Alken, Diol und Epoxid genauer in Augenschein genommen.

4.3.3.1 Diskussion der Strukturwirkungsbeziehung von *E64c-like*- und *CA028-like-(E)*-Alken-Tripeptiden

Aufgrund der Hemmdaten des vorausgehenden Screenings der *CA028-like-(Z)*-Alken-Peptide gegen *Papain latex* und *Cathepsin B* (nicht in dieser Arbeit beschrieben), sowie die in dieser Arbeit ermittelten Hemmwerte der *E64c*- und *CA028-like-(E)*-Alken-Peptide bestätigen, dass eine *trans*- bzw. *E*-Konfiguration der Alken-„Warheads“ für die Hemmung

der getesteten papainähnlichen Cysteinproteasen die Voraussetzung für eine selektive und irreversible Hemmung der Proteasen liefern. Die *trans*- bzw. *E*-Konfiguration der Alken-„Warheads“ induziert die spezifische Orientierung der Alken-Peptide im aktiven Zentrum der Protease und infolge dessen den Richtigen Abstand für den nucleophilen Angriff des Thiolats auf das Michael-System des Peptids. Für die getesteten *CA028-like*-(*Z*)-Alken-Peptide wurde keine bzw. ausschließlich eine unspezifische nicht-zeitabhängige Hemmung der getesteten Proteasen beobachtet. Vergleicht man die Hemmdaten der *E64c*- und *CA028-like*-(*E*)-Alken-Peptide, bezüglich der getesteten Proteasen, so zeichnet sich sowohl für die Papaine als auch Cathepsine eine Bevorzugung des *E64c-like*- gegenüber dem *CA028-like*-Peptids in Verbindung mit einem (*E*)-Alken-„Warhead“ deutlich ab. Das *E64c-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH-Peptid (**541**) weist gegen *Papain latex* und *carica* die größte Aktivität innerhalb der getesteten *E64c*- und *CA028-like*-(*E*)-Alken-Peptide auf. Interessanterweise trägt **541** eine benzylgeschützte Carboxyfunktion (Asp-Seitenkette), welche aufgrund der enormen Länge möglicherweise nicht mit der S1-Seite, sondern S1'-Seite der Papaine interagiert. Das seitenkettenentschützte *E64c-like*-(*E*)-Alken-Asp(COOH)-OH-Peptid (**542**) konnte aufgrund von Löslichkeitsprobleme nicht charakterisiert werden.

Für Cathepsin B sind die bestimmten Hemmwerte der *E64c*- und *CA028-like*-(*E*)-Alken-Peptide im Vergleich zu den -Diol- und -Epoxy-Peptiden vernachlässigbar, wobei zu erwähnen ist, dass im Fall von CatB *CA028-like*-(*E*)-Alken-Asp-OH (**557**) das aktivste Alken-Tripeptid war. Die erhaltenen k_{2nd} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Alken-Peptide liegen im Bereich der für DC-11 (**22**), publizierten Daten oder besser. Gegenüber Cathepsin L waren die Alken-Peptide im Gesamten eher mäßig aktiv, wobei auch hier ein *E64c-like*-Alken-Peptid bevorzugt akzeptiert wurde, jedoch handelt es im Fall von CatL um das Phenyl-substituierte *E64c-like*-Alken-Peptid (**537**), und nicht wie gegen die Papaine um **541**. Das *E64c-like*-Dipeptidmotiv scheint maßgeblich für Selektivität der *E64c-like*-(*E*)-Alken-Tripeptide innerhalb der getesteten papainähnlichen Cysteinproteasen verantwortlich zu sein.

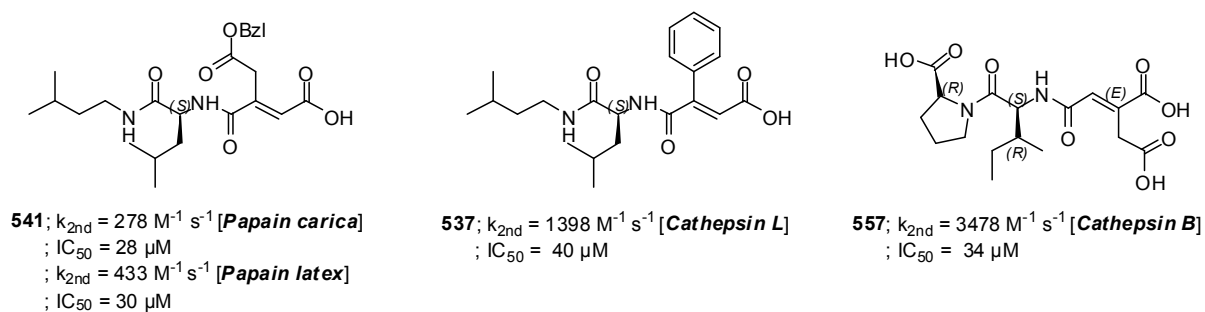


Abbildung 155: Strukturelle Übersicht der aktivsten *E64c*- und *CA028-like*-(*E*)-Alken-Peptide, sowie deren IC_{50} - und k_{2nd} -Werte in Verbindung mit der jeweiligen Cysteinprotease.

Die beiden Papaine (*latex* und *carica*) als auch Cathepsin L besitzen keine „occluding loop“ mit der das Pro-Ile-Motiv der *CA028-like*-Alken-Peptide spezifisch wechselwirken könnte, und akzeptieren daher bevorzugt das Isopentylamid-Leu-Motiv der *E64c-like*-Alken-Verbindungen, dass aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften selektiv mit den S3-Oberflächen, als auch der hydrophoben S2-Tasche durch die Leucinseitenkette interagiert. Gegen Cathepsin B wurde aber aufgrund der induzierten Wechselwirkung der Carboxyfunktion des Prolins von *CA028-like-(E)*-Alken-Asp-OH (**557**) mit den Histidin (His^{110} , His^{111}) der „occluding loop“ eine geringfügige Bevorzugung des *CA028-like*-Motivs beobachtet. Die S1-Seite von Papain *latex* bzw. *carica*, sowie die von Cathepsin L ist in der Lage größere Seitenketten als Cathepsin B zu beherbergen, da die S1-Seite von CatB aufgrund hineinragender Seitenketten der Aminosäuren Asp und Glu einen kleineren Raum bietet. Eine direkte Interaktion der Asp-Seitenkette von **557** mit dem partiell negativ-geladenen Milieu der S1-Seite von Cathepsin B ist daher eher auszuschließen.

Das Michaelssystem der getesteten *E64c*- bzw. *CA028-like*-Alken-Peptide scheint im direkten Vergleich zu den –Epoxy-Peptiden aufgrund der erheblich schlechteren Hemmkonstanten und den daraus resultierenden hohen Konzentration ungeeignet für die Entwicklung neuer irreversibler Cysteinprotease-Inhibitoren als Therapeutika zu sein. Die wesentlich geringere Aktivität der Alken-Peptide liegt zum einen in den verminderten Affinitäten (K_i) zur Protease, aber hauptsächlich in ihren langsamen Alkylierungsraten (k_i) begründet, die weit unter denen der getesteten Epoxy-Peptide liegen. Vergleicht man jedoch die Hemmwerte der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Alken-Peptide mit denen des Referenz-Inhibitors DC-11 so stellt man fest, dass der Großteil der Verbindungen vergleichbar ist, und um ein Vielfaches aktiver als der klassische Cysteinprotease-Inhibitor, *N*-Ethylmaleimid^[96] sind. Eine signifikante Zunahme der Aktivität wurde nur für einzelne Alken-Peptide beobachtet, wobei der k_{2nd} -Wert um das 5-fache im Vergleich zu DC-11 anstieg (Abbildung 155). Die teilweise größeren k_{2nd} -Werte der Alken-Peptide sind hauptsächlich auf eine Zunahme der Affinität ($>K_i$ -Werte als DC-11) zurückzuführen, da die entsprechenden k_i -Werte im Bereich der für DC-11 bestimmten Werte liegen. Die teilweise größere Affinität der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Alken-Peptide resultiert möglicherweise aus der Wechselwirkung der Alken-Seitenketten mit der S1-Seite oder einer anderen Oberfläche des Enzyms.

Zusammenfassend wurden für die *E64c*- und *CA028-like*-Alken-Tripeptide zwar keine außergewöhnlichen Hemmdaten erhalten, die bestimmten Werte geben aber dennoch Anlass das inhibitorische Potential dieser Verbindung gegen weitere papainähnliche Proteasen zu untersuchen. Desweiteren mag eine Weiterentwicklung der Alken-Peptide als Therapeutikum derzeit ausgeschlossen werden, ein möglicher Einsatz als Affinitätslabel ist aber dennoch denkbar.

4.3.3.2 Diskussion der Strukturwirkungsbeziehung von *E64c-like*- und *CA028-like*-(*S,S*)- bzw. -(*R,R*)-Diol-Tripeptiden

Die bemerkenswerten Aktivitäten der *E64c*- und *CA028-like*-Diol-Peptide wurden in dieser Form nicht erwartet, da bisher noch keine Daten zur Hemmung von papainähnlichen Cysteinproteasen durch ähnliche oder analoge Verbindungen veröffentlicht wurden. Eine Diskussion der möglichen Ursachen für die signifikanten Hemmungen der getesteten Proteasen durch die Diol-Peptide ist daher mehr als spekulativ, aber es soll dennoch die strukturellen Eigenschaften in Bezug zu den bestimmten Hemmwerten erörtert werden. Eine Abhängigkeit der Selektivität und Aktivität bezüglich eines *E64c*- oder *CA028-like*-Dipeptidmotivs war in Verbindung mit den Diol-„Warheads“ kaum zu beobachten. Während gegen *Papain carica* ein *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Leu-OH-Peptid (**567**) die stärkste Hemmung ($IC_{50} = 8 \mu M$) aufwies, war gegen *Papain latex* das *CA028*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH-Peptid (**588**; $IC_{50} = 12 \mu M$) die aktivste Verbindung. Diese Unstimmigkeit liegt möglicherweise daran, dass sowohl **588** als auch **567** gegen *Papain latex* bzw. *carica* vergleichbare IC_{50} -Werte aufweisen, so dass sich die beiden Verbindungen **567** und **588** kaum in ihrer Aktivität gegen die beiden Papaine unterscheiden (s. Abbildung 156). Auffällig ist die Tatsache, dass es sich nicht nur um die gleichen Diol-Verbindungen handelt, sondern auch um die gleichen Enantiomere, (*R,R*) **588** und (*S,S*) **567** die eine reversible Hemmung gegenüber den beiden Papainen zeigten. Die IC_{50} -Werte von **567** ($IC_{50} = 8 \mu M$) gegen *Papain carica* und **588** ($IC_{50} = 12 \mu M$) gegen *Papain latex* liegen im unteren mikromolaren Bereich. Im direkten Vergleich zu den irreversiblen Alken-Peptiden sind sie bezüglich der IC_{50} -Werte deutlich aktiver. Aufgrund der ähnlichen Hemmdaten der *E64c*- und *CA028-like*-Dirole erhärtet sich der Verdacht, dass das jeweilige Dipeptid-Motiv (*E64c*- bzw. *CA028-like*) im Fall der Papaine keine oder nur eine untergeordnete Rolle hinsichtlich der Aktivität der einzelnen Verbindungen spielt. Der Einfluss der unterschiedlichen Seitenketten (Diol-„Warhead“) kann aufgrund fehlender Referenzdaten und der ähnlichen IC_{50} -Werten der beiden Diol-Peptide gegen die Papaine derzeit nicht beurteilt werden.

Gegen Cathepsin L wurde ausschließlich für das *E64c-like*-(*R,R*)-Diol-Leu-OH-Peptid (**571**) eine signifikante Hemmung ($IC_{50} = 19 \mu M$) nachgewiesen. Interessanterweise war es im Fall von CatL ein (*R,R*)-konfigurierter Diol-Leu-OH-„Warhead“ in Verbindung mit einem *E64c-like*-Dipeptidmotiv, und nicht wie gegen die Papaine die inverse, (*S,S*)-konfigurierte Verbindung (**567**). Das *E64c-like*-Dipeptidmotiv scheint maßgeblich an der gesteigerten Aktivität gegenüber CatL im Vergleich zu den *CA028-like*-Peptiden beteiligt zu sein. Innerhalb der *E64c-like*-Diol-Peptide kommt es gegen CatL zur deutlichen Bevorzugung bzw. Aktivitätszunahme in Verbindung mit der Leu-Seitenkette von (**571**) gegenüber der Phenyl-substituierten Verbindung (**568**). Cathepsin L verfügt über die größte S1-Seite der getesteten

Proteasen, so dass eine Interaktion der Leu-Seitenkette von (**571**) mit der S1-Seite von CatL prinzipiell möglich wäre. Eine Abhängigkeit der Aktivität bezüglich der Stereoinformation (*S,S* bzw. *R,R*) der *E64c-like*-Peptide kann nicht beurteilt werden, da die beiden aktivsten Verbindungen **571** (*R,R*) und **568** (*S,S*) eine inverse Konfiguration aufweisen.

Die bemerkenswertesten Aktivitäten der Diol-Tripeptide wurden aber gegen Cathepsin B bestimmt. Auf Grundlage der während des Screenings (Inhibitorkonzentration = 30 μ M) bestimmten prozentualen Hemmwerte von *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH (**568**, p.H. 99%) und *CA028-like*-(*R,R*)-Diol-Phg-OH (**588**, p.H. 92%) wurde ein vergleichbares inhibitorisches Potential für beide Verbindungen angenommen. Die anschließenden Bestimmungen der IC_{50} -Werte offenbarte aber, dass das *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH-Peptid (**568**, IC_{50} = 0.057 μ M) eine um das 50-fache größere Aktivität gegen Cathepsin B aufweist, als die *CA028-like*-Diol-Verbindung (**588**, IC_{50} = 3.2 μ M).

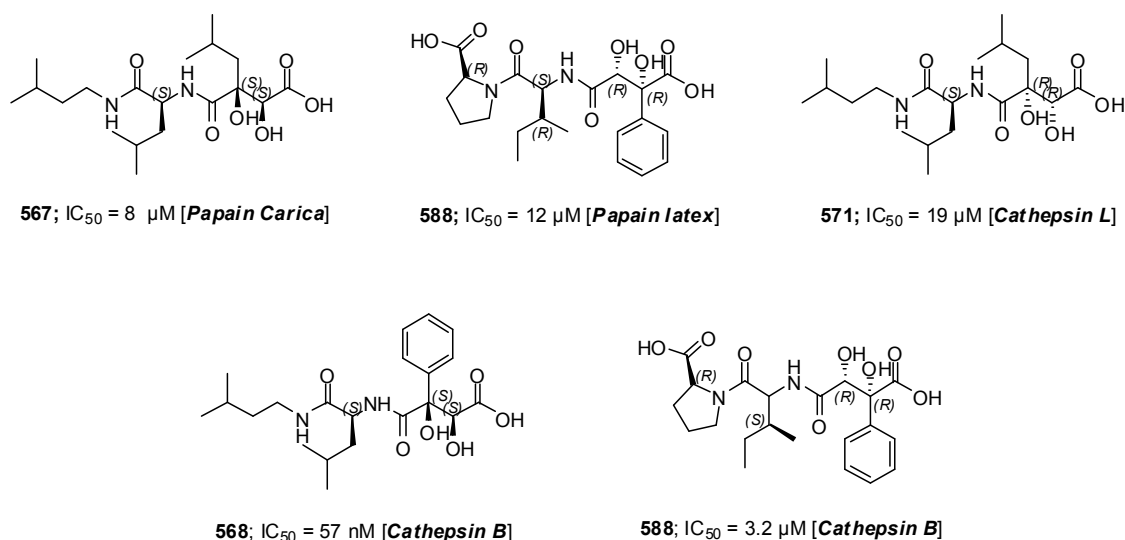


Abbildung 156: Strukturelle Übersicht der aktivsten *E64c*- und *CA028-like*-(*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Diol-Tripeptide, sowie deren IC_{50} - und k_{2nd} -Werte in Verbindung mit der jeweiligen Cysteinprotease.

Im Fall von Cathepsin B zeichnet sich wie gegen die Papainen, ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Konfiguration (*S,S* bzw. *R,R*) der Diol-„Warheads“ in Verbindung mit dem entsprechenden Dipeptidmotiv (*E64c*- bzw. *CA028-like*) ab. In beiden Fällen handelt es sich um ein Phenyl-substituiertes, *E64c-like*-(*S,S*)-Diol- (**568**) bzw. *CA028-like*-Diol-(*R,R*)-Peptid (**588**), jedoch mit inverser Konfiguration am Diol-„Warhead“. Der größte Unterschied der beiden Diol-Verbindungen **568** und **588** ist in ihrem Dipeptidmotiv begründet, und nimmt daher wahrscheinlich auch eine übergeordnete Stellung bezüglich der Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum ein. Die (*S*)-konfigurierte Phenylseitenkette des

Diol-„Warheads“ steigert aber nochmals signifikant die Aktivität von **568** im Vergleich zu den anderen getesteten Seitenketten (Ala, Leu, Phe) des Diol-„Warheads“ in Verbindung mit einem *E64c-like*-Dipeptidmotiv. Unter diesem Gesichtspunkt setzt sich die überragende Aktivität von **568** additiv aus dem *E64c-like*-Dipeptidmotiv, der Phg-Diol-Seitenkette und dessen Konfiguration (*S,S*) zusammen.

Die interessanten Ergebnisse der Diol-Peptide und im speziellen die von *E64c-like*-(*S,S*)-Diol-Phg-OH (**568**, $IC_{50} = 0.057 \mu M$) gegen Cathepsin B geben Anlass die biologischen Aktivitäten dieser neu Verbindungsklasse in umfangreichen Studien näher zu untersuchen. Erste Anhalte bezüglich der Orientierung bzw. Wechselwirkungen der Diol-Peptide innerhalb des aktiven Zentrums der getesteten Proteasen liefern wahrscheinlich weiterführende Docking-Experimente.

4.3.3.3 Diskussion der Strukturwirkungsbeziehung von *E64c-like*- und *CA028-like*-(*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Epoxy-Tripeptiden

Die stark elektrophilen *E64c*- und *CA028-like*-Epoxy-Peptide nehmen aufgrund der erhaltenen Hemmwerte eine Sonderstellung innerhalb der getesteten Tripeptide ein. Der Oxiranring der Epoxy-Peptide ist um ein Vielfaches reaktiver als das Michaelssystem der Alken-Peptide, was sich direkt in den Alkylierungsraten, und infolge dessen in den k_i -Werten der Epoxy-Peptide widerspiegelt (Abbildung 157). Gegen Cathepsin L und die beiden Papaine (*latex* und *carica*) kam es zu einer Bevorzugung der *E64c-like*- gegenüber den *CA028-like*-Epoxy-Peptiden, ähnlich wie für die getesteten Alken-Peptide. Diese Beobachtung wird auch durch die publizierten Daten der Referenzinhibitoren, *E64c* (**24**) und *CA028* (**33**) gestützt. Die gegen *Papain latex* und *carica* erhaltenen Hemmdaten der getesteten Epoxy-Peptide übertreffen größtenteils die publizierten k_{2nd} -Werte der Referenzinhibitoren. Die k_{2nd} -Werte der *E64c-like*-Epoxy-Peptide (**610** und **612**) liegen deutlich über den Werten der *CA028-like*-Epoxy-Verbindung (**617**), sowohl das gegen *Papain latex* gerichtete *E64c-like*-(*S,S*)-Epoxy-Phg-OH-Peptid (**610**; $k_{2nd} = 56756 M^{-1} s^{-1}$) als auch das gegen *Papain carica* gerichtete *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH-Peptid (**612**; $k_{2nd} = 950000 M^{-1} s^{-1}$). Die Hemmwerte von *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH (**617**) gegen *Papain latex* ($k_{2nd} = 1840 M^{-1} s^{-1}$) und *carica* ($k_{2nd} = 13750 M^{-1} s^{-1}$) sind im Gegensatz dazu verhältnismäßig bescheiden. Der Einfluss der Phenyl- (**610**) bzw. β -Fluor-Ala-Seitenketten (**612**) auf die Aktivität der *E64c-like*-Epoxy-Peptide bezüglich der Papaine kann derzeit nicht beurteilt werden, sicher ist jedoch, dass die *E64c-like*-Epoxy-Peptide gegen die Papaine um ein Vielfaches aktiver sind als die korrespondierenden *CA028-like*-Epoxy-Verbindungen. Gegen Cathepsin L war das *E64c-like*-(*rac*)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH-Peptid (**612**; $k_{2nd} = 658330 M^{-1} s^{-1}$), wie auch schon gegen *Papain carica* deutlich aktiver als das *CA028-like*-

(*R,R*)-Epoxy-Ala-OH-Peptid (**617**, $k_{2nd} = 42857 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Für die *E64c*- und *CA028-like*-Epoxy-Peptid wir im aktiven Zentrum von CatL ein inverser Bindungsmodus angenommen, so dass der direkte Vergleich der Methyl- (**617**) bzw. β -Fluor-Ala-Seitenketten (**612**) der beiden Epoxy-Peptide nicht möglich ist. Die fluoriierte Verbindung **612** hob sich hinsichtlich ihrer Hemmwerte deutlich von den anderen getesteten *E64c-like*-Epoxy-Peptiden ab. Die k_{2nd} -Werte des Referenzinhibitors E-64c ($k_{2nd} = 206000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und **612** ($k_{2nd} = 658330 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und sind vergleichbar, wobei die für **612** bestimmten k_{2nd} -Werte die für E-64c publizierten Werte um das 3-fache übersteigen. Weiterhin auffällig ist die Tatsache, dass die überlegene Hemmung von CatL durch *E64c-like-(rac)*-Epoxy- β -Fluor-Ala-OH (**612**; $K_i = 0.12 \text{ }\mu\text{M}$) im Vergleich zu *CA028-like-(R,R)*-Epoxy-Ala-OH (**617**; $K_i = 0.96 \text{ }\mu\text{M}$) in der größeren Affinität (K_i) zur Protease begründet liegt. Die Alkylierungsrate (k_i) von **612** ($k_i = 0.096 \text{ s}^{-1}$) liegt zwar auch über der von **617** ($k_i = 0.042 \text{ s}^{-1}$), ist aber nicht die Ursache für den signifikanten Aktivitätsunterschied der beiden Verbindungen (Abbildung 157). Die gesteigerte Affinität von **612** im Vergleich zu **617** kann wahrscheinlich Größtenteils auf das *E64c-like*-Peptidmotiv zurückzuführen werden, wobei die Zunahme der Alkylierungsrate von **612** ($k_i = 0.096 \text{ s}^{-1}$) im Vergleich zu **617** ($k_i = 0.042 \text{ s}^{-1}$) entweder auf eine vorteilhafte Positionierung des Epoxy-„Warheads“ im aktiven Zentrum, oder auf die erhöhte Elektrophilie des Oxiranrings (Epoxy-„Warhead“) infolge des $-I$ -Effekts des Fluor-Substituenten zurückzuführen ist.

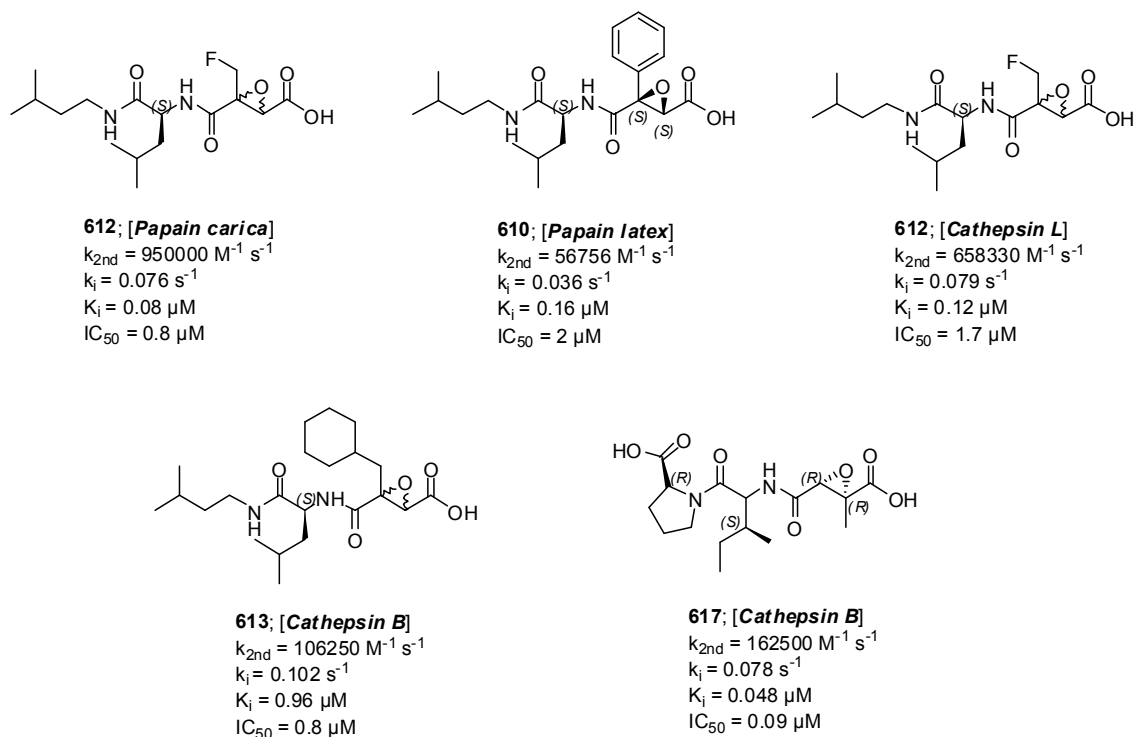


Abbildung 157: Strukturelle Übersicht der aktivsten *E64c*- und *CA028-like*-Epoxy-Tripeptide, sowie deren IC_{50} - und k_{2nd} -Werte in Verbindung mit der jeweiligen Cysteinprotease.

Gegen Cathepsin B wurde sowohl für das *E64c-like*-(rac)-Epoxy-Cha-OH- (**613**), als auch das *CA028-like*-(R,R)-Epoxy-Ala-OH-Peptid (**617**) beachtliche k_{2nd} -Werte ermittelt. Der k_{2nd} -Wert von **617** ($k_{2nd} = 162500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) übersteigt den von **613** ($k_{2nd} = 106250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) signifikant, der größte Unterschied liegt jedoch in den IC_{50} -Werten von **617** ($IC_{50} = 0.09 \text{ }\mu\text{M}$) versus **613** ($IC_{50} = 0.8 \text{ }\mu\text{M}$) begründet. Vergleicht man die Hemmdaten der beiden Epoxy-Peptide **613** und **617** miteinander (Abbildung 157) so fällt auf, dass **617** ($k_i = 0.078 \text{ s}^{-1}$, $K_i = 0.48 \text{ }\mu\text{M}$) langsamer (k_i) mit CatB reagiert, aber eine größere Affinität (K_i) zur Protease aufweist als **613** ($k_i = 0.102 \text{ s}^{-1}$, $K_i = 0.96 \text{ }\mu\text{M}$). Für die Referenzinhibitoren CA074 und E-64c wurden vergleichbare k_{2nd} -Werte publiziert. Die gesteigerte Affinität von *CA028-like*-(R,R)-Epoxy-Ala-OH (**617**) im Vergleich zu *E64c-like*-(rac)-Epoxy-Cha-OH (**613**), kann hauptsächlich auf das *CA028-like*-Peptidmotiv zurückgeführt werden, da in Verbindung mit Cathepsin B die besonderen Strukturellen Eigenschaften dieser Verbindung eine selektive Wechselwirkung mit der „occluding loop“ der Protease induzieren. In wie weit die Methyl-Seitenkette von **617** einen Einfluss auf die Aktivität bzw. Selektivität der Verbindung ausübt kann anhand der bestimmten Hemmdaten nur schwer beurteilt werden, da sich die k_{2nd} -Werte von **617** und CA074 (Referenzinhibitor) kaum unterscheiden.

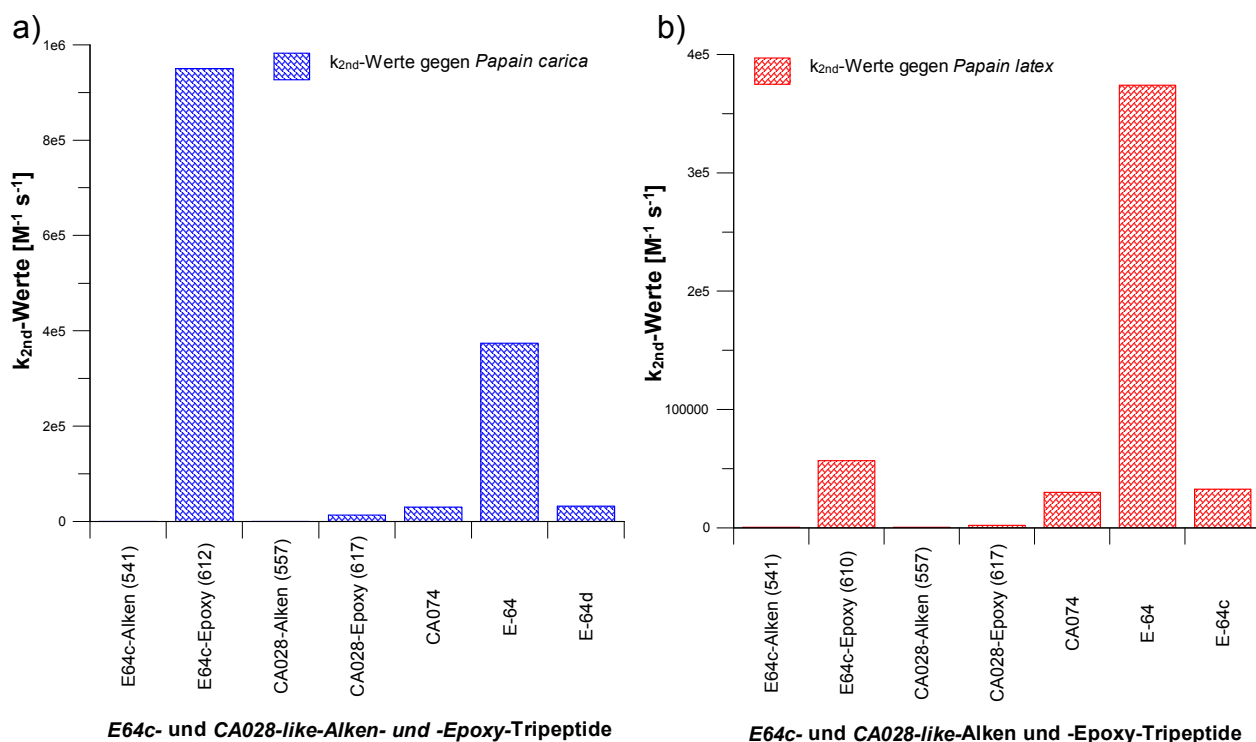


Abbildung 158: Graphische Darstellung der k_{2nd} -Werte der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Alken und -Epoxy-Tripeptide; a) k_{2nd} -Werte der *E64c-like*- (**541**, **612**) und *CA028-like*-Peptide (**557**, **617**) gegen *Papain carica*; b) k_{2nd} -Werte der *E64c-like*- (**541**, **610**) und *CA028-like*-Peptide (**557**, **617**) gegen *Papain latex*.

Die für *E64c-like*-(rac)-Epoxy-Cha-OH (**613**) bestimmten K_{2nd} -Werten liegen unter den für E-64c (Referenzinhibitor) publizierten Werten. Die Unterschiede der beiden Verbindungen sind in der Cyclohexylseitenkette und der Stereoinformation des Epoxy-„Warheads“ zu finden. Möglicherweise kommt es aufgrund der sterisch anspruchsvollen Cyclohexylseitenkette von **613** zu einer Verzerrung der Bindungsgeometrie, und Infolge dessen zu einer unvorteilhaften Positionierung des Oxiranrings innerhalb des aktiven Zentrums der Protease. Desweiteren handelt es sich bei **613** um ein racemisches Epoxy-Peptid, wohingegen E-64c in enantiomerenreiner Form eingesetzt wurde. Im Fall, dass nur ein Enantiomer von **613** aktiv ist, würde das auch die verringerte Aktivität erklären.

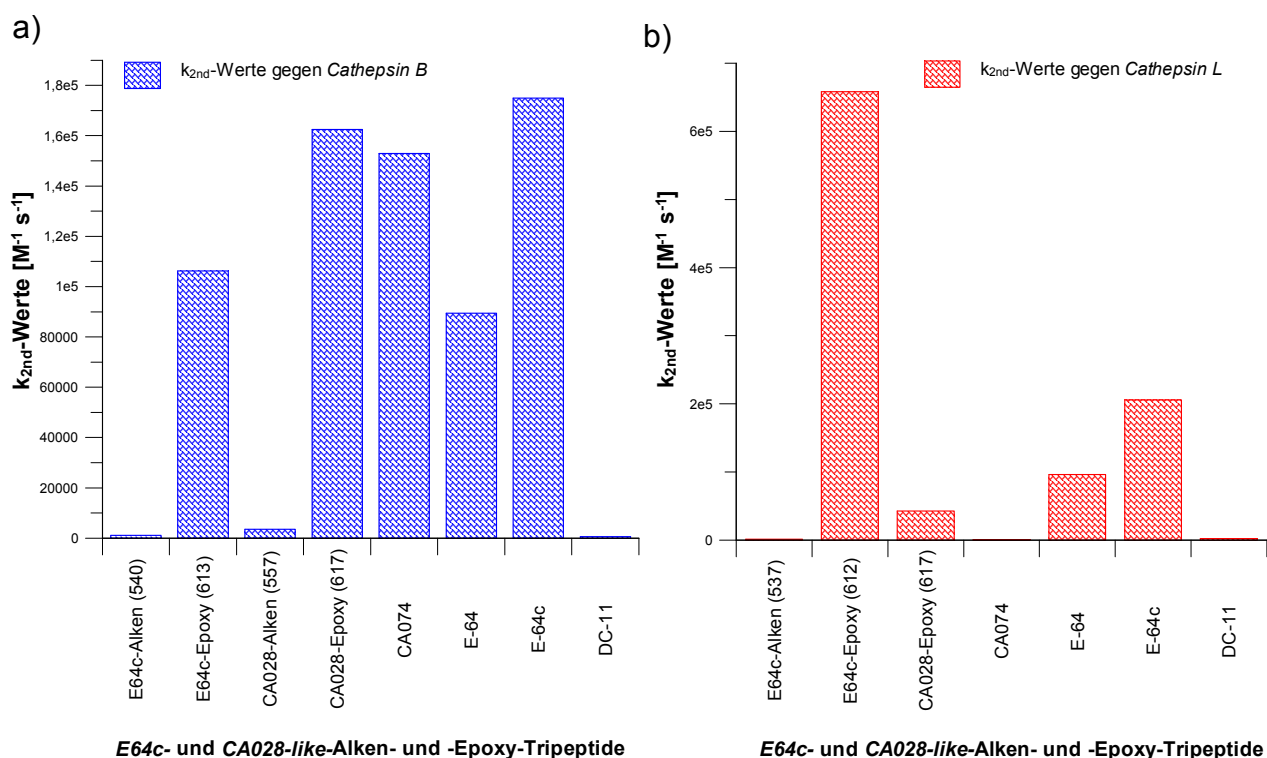


Abbildung 159: Graphische Darstellung der k_{2nd} -Werte der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Alken- und -Epoxy-Tripeptide; a) k_{2nd} -Werte der *E64c-like*- (**540**, **613**) und *CA028-like*-Peptide (**557**, **617**) gegen *Cathepsin B*; b) k_{2nd} -Werte der *E64c-like*- (**537**, **612**) und *CA028-like*-Peptide (**617**) gegen *Cathepsin L*.

Insgesamt kann resümiert werden, dass sowohl einzelne, *E64c*- bzw. *CA028-like*-Alken-, -Diol- und -Epoxy-Tripeptide ein bemerkenswertes inhibitorisches Potential hinsichtlich der getesteten papainähnlichen Cysteinproteasen aufweisen. Die verwendeten Peptidmotive, *E64c*- und *CA028-like* üben für die meisten Verbindungen eine vorgelagerte Selektivität bzw. Affinität aus, wobei diese hauptsächlich in Verbindung mit den *E64c*- und *CA028-like*-Alken- und -Epoxy-Peptiden zu tragen kommt. Für die *E64c*- und *CA028-like*-Diol-Verbindungen

kann hinsichtlich des Einflusses des Dipeptid-Motivs auf die Aktivität nur spekuliert werden, jedoch wurde mehrmals ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Konfiguration der Diol-„Warheads“ in Verbindung mit nur einem *E64c-* bzw. *CA028-Motiv* beobachtet. Ein Vergleich der erhaltenen Hemmdaten (Abbildung 158 und 159) deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen den P1-Seitenketten der Tripeptide und dem inhibitorischen Potential der Verbindungen hin. In Abhängigkeit von dem verwendeten Warhead nimmt jedoch sukzessive die Größe der P1-Reste („Warhead“-Seitenkette) ab (Alken > Diol > Epoxid), einzig die *E64c-like*-Epoxy-Peptide, **610** und **613** besitzen einen großen Rest. Aufgrund der vielversprechenden Daten scheint eine Ausdehnung des Screenings gegen ein breiteres Spektrum papainähnlicher Proteasen sinnvoll. Eine Testierung gegen virale, parasitäre, und bakterielle Cysteinproteasen wäre auch von großem Interesse. Die beachtlichen Aktivitäten der *E64c-* und *CA028-like*-Diol-Peptide geben Anlass die Synthese auf eine umfangreiche Diol-Tripeptid-Bibliothek auszudehnen, und diese in weiterführenden Studien bezüglich ihrer biologischen Aktivitäten zu untersuchen. Vorerst sollen aber erste Docking-Experimente einen Einblick in die möglichen Orientierungen der aktiven Verbindungen innerhalb des aktiven Zentrums der getesteten Proteasen gewähren, um im Anschluss die vermeintlich geeignetsten Verbindungen weiter zu optimieren.

4.4 Antibakterielle Testierung von *E64c-* und *CA028-like*-Tripeptiden und deren synthetische Intermediate

Bakterielle Resistenzen sorgen zunehmend dafür, dass Reserveantibiotika heutzutage teilweise bei der Ersttherapie eingesetzt werden müssen. Die Suche nach neuen Wirkstoffen und Wirkstoffklassen gegen bakterielle Infektionen muss daher verstärkt vorangetrieben werden. Das Spektrum antibakterieller Verbindungen reicht von Glykopeptiden, Sulfonamiden, β -Lactamen, Tetracyklinen und Polyketiden über Phenylpropanoide, Aminoglycoside und Makrolide bis hin zu synthetischen Chinolonen oder Oxazolidinonen.^[6] Es ist ein breites Spektrum peptidischer Wirkstoffe bekannt. Hierzu zählen beispielsweise Lipopeptide (z.B. Daptomycin), Glycopeptide (z.B. Vancomycin) aber auch Depsipeptide wie Enniatin. Die meisten Vertreter der aufgezählten Substanzklassen sind entweder pilzlichen oder bakteriellen Ursprungs. Verbindungen, die das Wachstum von Bakterien hemmen, werden auch als antimikrobielle Wirkstoffe bezeichnet. Antimikrobielle Peptide (*antimicrobial peptides*, AMPs) besitzen im Regelfall eine relativ geringe Kettenlänge von 12 bis 100 Aminosäuren^[382] und hemmen bakterielles Wachstum, je nach Vertreter einer Substanzklasse, durch Interaktion mit einer Vielzahl unterschiedlicher Targets. Sie zeigen antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive Mikroorganismen, einschließlich der wichtigen

Krankheitserreger wie *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, zahlreiche Streptokokken, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* u.v.m. Gegen Gram-negative Mikroorganismen zeigen die Glycopeptide so gut wie keine antibakterielle Aktivität, da diese eine äußere Membran besitzen. Eine Passage dieser Membran erfolgt i.d.R. lediglich durch die Poren von Membranproteinen. Die Wirkungsweise der Glycopeptid-Antibiotika wird folgendermaßen erklärt: Das Makromolekül, aus welchem sich die Zellwand zusammensetzt, heißt Peptidoglykan. Es besteht aus linearen Polysaccharidketten, die durch Peptide quervernetzt sind. Diese Pentapeptideinheiten der Sequenz D-Ala-D-Ala-Lys-D-γGlu-Ala werden durch einen Lysin-γ-NH₂-Angriff an das D-Ala-D-Ala am Ende eines benachbarten Stranges verknüpft, wobei ein Molekül D-Ala freigesetzt wird. Die Glycopeptid-Antibiotika binden mit einer hohen Affinität an die D-Ala-D-Ala-Sequenz dieser Pentapeptide und inhibieren die Quervernetzung der Polysaccharidstränge. Ist nicht die direkte Einwirkung auf die bakterielle Zellmembran der Grund für einen pharmakologischen Effekt der Peptide, so sind bakterielle DNA-Replikation, mRNA-Synthese, Proteinsynthese, Proteinfaltungsvorgänge, Zellwandbiosynthese oder Aminoglycosid-modifizierende Enzyme die häufigsten Ziele von antibiotischen Peptidwirkstoffen.^[128]

Ein Beispiel hierfür ist das natürlich vorkommende Antibiotikum Fosfomycin (Abbildung 160), das von Streptomyces-Pilzen synthetisiert wird. Die Entdeckung erfolgte im Rahmen einer Untersuchungsreihe in diversen Pilzkulturen im Jahr 1969. Fosfomycin (**627**) ist ein kleines, wasserlösliches Molekül mit einer kleinen Molekülmasse und einer ungewöhnlich einfachen Struktur (L-*cis*-1,2-Epoxypropylphosphor-säure). Es besitzt eine für die antibakterielle Wirksamkeit verantwortliche Epoxygruppe und ein direkt an den Kohlenstoff des Oxiranrings gebundenes Phosphoratom. Fosfomycin ist der einzige Vertreter der Epoxid-Antibiotikagruppe und wirkt bakterizid gegen zahlreiche Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie verschiedene Anaerobier. Kreuzresistenzen und Allergien mit anderen Antibiotika wurden aufgrund der andersartigen Struktur und Wirkungsweise bisher nicht beschrieben. Da Fosfomycin praktisch nicht an Proteine gebunden wird und eine extrem niedrige Molekülmasse besitzt, penetriert es ausgezeichnet in das Gewebe. In Weichteilen, Muskulatur, Wundsekreten, Liquor, ZNS, Knochen, Herz, Augen und Lungen wurden hohe Konzentrationen nachgewiesen, die deutlich über den MHK-Werten der wichtigsten Erreger lagen. Fosfomycin greift bereits in einem frühen Stadium in den Aufbau der Bakterienwand ein. Durch diese Wirkweise lässt sich die ausgezeichnete synergistische Wirkung mit anderen Antibiotika wie β-Laktamen, die ebenfalls an der Bakterienwand angreifen, erklären. Vor allem bei der Therapie von Problemkeimen wie MRSA und multiresistenten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen erweist sich Fosfomycin als sinnvoller Kombinationspartner. Fosfomycin (**627**) ist ein irreversibler Hemmstoff des Enzyms MurA (UDP-N-

Acetylglucosamin-enolpyruvyl-transferase). MurA katalysiert den ersten Schritt der Mureinbiosynthese: den Transfer einer Enolpyruvyleinheit aus Phosphoenolpyruvat (PEP) an UDP-*N*-Acetylglucosamin (UNAG). Die Produkte der Reaktion sind Enolpyruvyl-UDP-*N*-acetylglucosamin und Phosphat. Fosfomycin alkyliert die Thiolgruppe einer Cystein-Seitenkette (Cys-115, Nummerierung von *E. coli* MurA), die eine zentrale Rolle in der Katalyse besitzt (Abbildung 160).

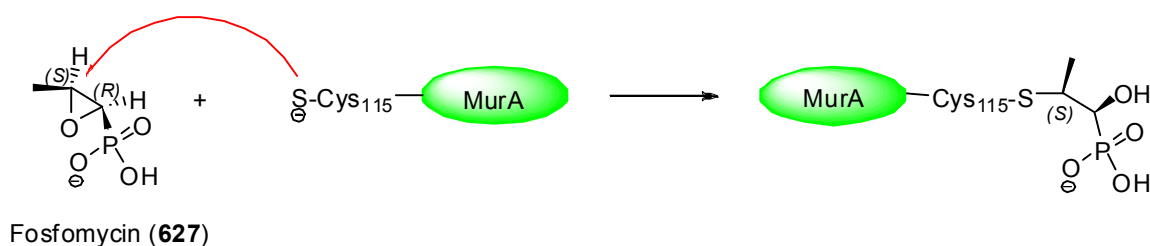


Abbildung 160: Irreversible Inaktivierung der UDP-*N*-Acetylglucosamin-enolpyruvyl-transferase (MurA) von *E. coli* durch die Alkylierung von Cystein¹¹⁵ mittels Fosfomycin (627).

Wie bei den anderen Wandsynthese-Hemmstoffen ist die Wirkung von Fosfomycin bakterizid. Der Angriffspunkt von Fosfomycin befindet sich innerhalb der Bakterienwand. Daher besteht natürlich die Notwendigkeit, dass Fosfomycin in das Bakterium eindringt. Als hydrophiles Molekül kann Fosfomycin jedoch nicht passiv durch die Bakterienwand diffundieren, sondern ist auf einen aktiven Transportmechanismus angewiesen. Dabei wird entweder das L- α -Glycerophosphat-Transportsystem oder, bei Vorhandensein von Glukose-6-Phosphat, das Hexose-Phosphat-Transportsystem verwendet. Fosfomycin wirkt spezifisch auf die bakterielle Zellwandbiosynthese und interferiert nicht mit der Zellwandbiosynthese menschlicher Zellen. Fosfomycin wirkt nach Penetration der Bakterienwand bakterizid gegen zahlreiche Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie verschiedene Anaerobier. Dazu gehören unter anderen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa*. Infolge seines einzigartigen Wirkmechanismus ist Fosfomycin sowohl bei Methicillin-empfindlichen als auch bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen erfolgreich einsetzbar. Durch seine hohe bakterizide Aktivität gegen Staphylokokken, seine gute Penetrationsfähigkeit und die synergistische Wirkung mit anderen Antibiotika ist Fosfomycin ein viel versprechendes Therapeutikum bei Infektionen mit MRSA.

Aufgrund des analogen Inaktivierungsmechanismus von Fosfomycin und den in dieser Arbeit dargestellten *E64c*- und *CA028-like*-Cysteinprotease-Inhibitoren, sowie der strukturellen Ähnlichkeiten mit den synthetischen Intermediaten (Epoxide, Diole, Alkene), wurden

ausgewählte *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide (Abbildung 164) und deren synthetische Intermediate (Abbildung 161 und 162) in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-Chem. Nicole Sattler auf ihre antibakterielle Wirkung hin untersucht. Ermittelt wurden die Hemmhöfe für vier unterschiedliche Problemkeime, zu denen der Gram-negative *Escherichia coli*, sowie die Gram-positiven Erreger *S. aureus*, *B. subtilis* und *M. phlei* gehören, untersucht. Das Hemmvermögen der Verbindungen wird dabei über den Durchmesser der Hemmhöfe im direkten Vergleich zu den Referenzantibiotika Apramycin, Chloramphenicol, Kanamycin und Tetracyclin ausgedrückt. Pro Agarplatte wurden dazu sechs sterile Antibiotika-Testblättchen auf den Agar aufgelegt und mit 10 µl der jeweiligen Probe beschichtet und anschließend für 18 h im Brutschrank inkubiert.^[vii] Das Hemmvermögen der getesteten Verbindungen wurde in 1, 5 und 10 mg/ml Konzentrationen, in Referenz zu den erwähnten Antibiotika (1mg/ml) ermittelt. Die Resultate der antibakteriellen Testierung sind in den Tabellen 20 und 21 zusammengefasst.

4.4.1.1 Antibakterieller Testierung der synthetischen Intermediate

Anhand Tabelle 20 ist ersichtlich, dass die synthetische Intermediate im Prinzip keine Aktivität gegen den Gram-negativen Erreger *E. coli* aufweisen. Eine geringfügige Hemmung des Wachstums wurde ausschließlich für vier Verbindungen ab Konzentrationen > 5 mg/ml beobachtet. Hierbei handelt es sich um die beiden (*E*)-Alkene-, -β-Fluor-Ala (**412**) und -Asp (**415**), die beiden (*S,S*)-Diole, -Phg (**456**) und -Leu (**455**) und das (*rac*)-Epoxy-Trp (**448**). Die Hemmhofgrößen ($\varnothing = 0.8$ cm) lag jedoch deutlich unter den Werten der Referenzantibiotika. Auf eine graphische Darstellung der Hemmhofdurchmesser wurde aufgrund der geringfügigen Wachstumshemmung verzichtet. Bezüglich des Gram-positiven *S. aureus* wurde so gut wie keine Aktivität der synthetischen Intermediate beobachtet, einzig das (*Z*)-Alken-Trp (**463**) und das (*rac*)-Epoxy-Chg (**443**) wiesen eine marginale Hemmung des Wachstums (bei 10 mg/ml) auf (Tabelle 20). Die signifikantesten Aktivitäten wurden gegen die beiden Gram-positiven Erreger, *B. subtilis* und *M. phlei* beobachtet. Gegen *M. phlei* waren die getesteten Verbindung nicht in direkt vergleichbaren Konzentration zu den eingesetzten Referenzantibiotika aktiv, jedoch zeigten einzelne Derivate, so wie das (*Z*)-Alken-Trp (**436**), (*E*)-Alken-β-Fluor-Ala (**412**) und (*S,S*)-Epoxy-Leu (**468**) ab einer Konzentration 5 mg/ml eine deutliche Hemmung des Wachstums (163b). Bei Konzentration > 10 mg/ml konnte für mehrere Verbindungen eine schwachen Hemmung des Wachstums von *M. phlei* nachgewiesen werden, wie anhand Tabelle 20 und Abbildung 163b entnommen werden kann. Relevante Wachstumshemmungen diverser Verbindungen wurden jedoch ausschließlich gegen *B.*

^[vii] für Details s. experimenteller Teil dieser Arbeit.

subtilis gefunden, wobei drei Derivate (**419**, **412**, **468**) besonders hervorzuheben sind (Abbildung 163a). Die deutlichste Wachstumshemmung von *B. subtilis* ging von der (*E*)-Alken- β -Fluor-Ala-Verbindung (**412**) aus, wobei **412** im direkten Vergleich nur ca. 50% der Aktivität der Referenzantibiotika erreichte. Für die Wachstumshemmung der beiden Gram-positiven Keime (*M. phlei* und *S. aureus*) fand sich eine bunte Mischung unterschiedlicher aktiver Verbindungen, hauptsächlich (*E*)-Alken- und (*S,S*)- bzw. (*rac*)-Epoxy-Verbindungen.

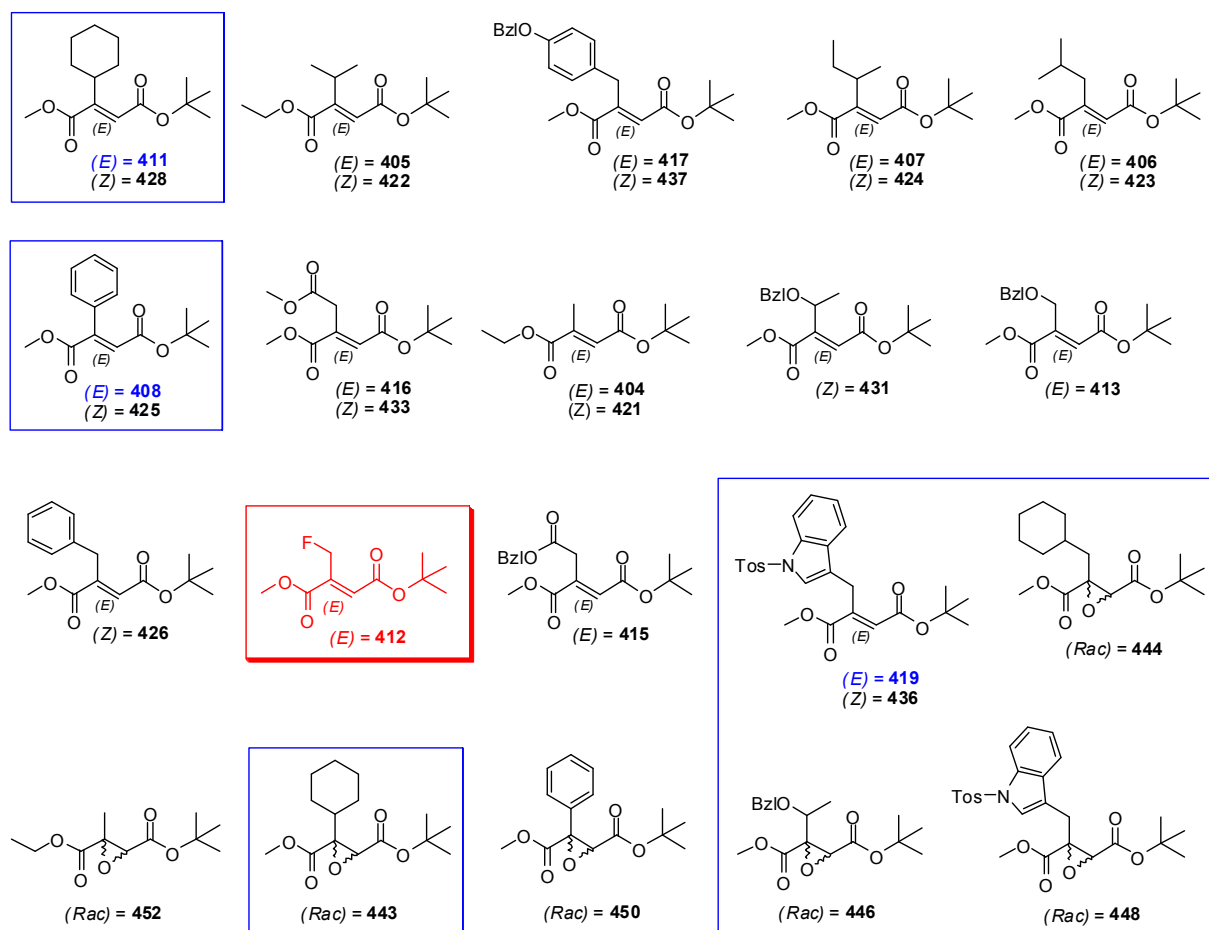


Abbildung 161: Übersicht der auf ihre antibakterielle Aktivität hin untersuchten synthetischen Intermediate, (*E*)- bzw. (*Z*)-Alken- und (*rac*)-Epoxy-„Warheads“. Strukturell sind ausschließlich die (*E*)-Alken und (*rac*)-Epoxy-„Warheads“ aufgeführt. Die Verbindungen mit signifikanter Aktivität sind blau gerahmt, und die aktivste Verbindung **412** ist in rot dargestellt.

Die Testergebnisse der drei aktivsten Verbindungen beinhaltet die beiden (*E*)-Alkene, - β -Fluor-Ala (**412**) und -Trp (**419**), sowie das (*S,S*)-Epoxy-Leu (**468**). Die drei Verbindungen sind aufgrund ihres elektrophilen Charakters in der Lage Enzyme, und hauptsächlich cysteinhaltige Enzyme in Form einer irreversiblen Alkylierung zu hemmen. In Bezug auf das

Target (MurA) des strukturanalogen Fosfomycins (Abbildung 160) und dessen spezifischen Wirkmechanismus, kann die Aktivität der oben genannten Verbindungen auf einen ähnlichen Mechanismus bzw. Target zurückgeführt werden, oder eine intrazelluläre physiologisch bedeutende Cysteinprotease sowie ein noch ungeklärtes Target betreffen.

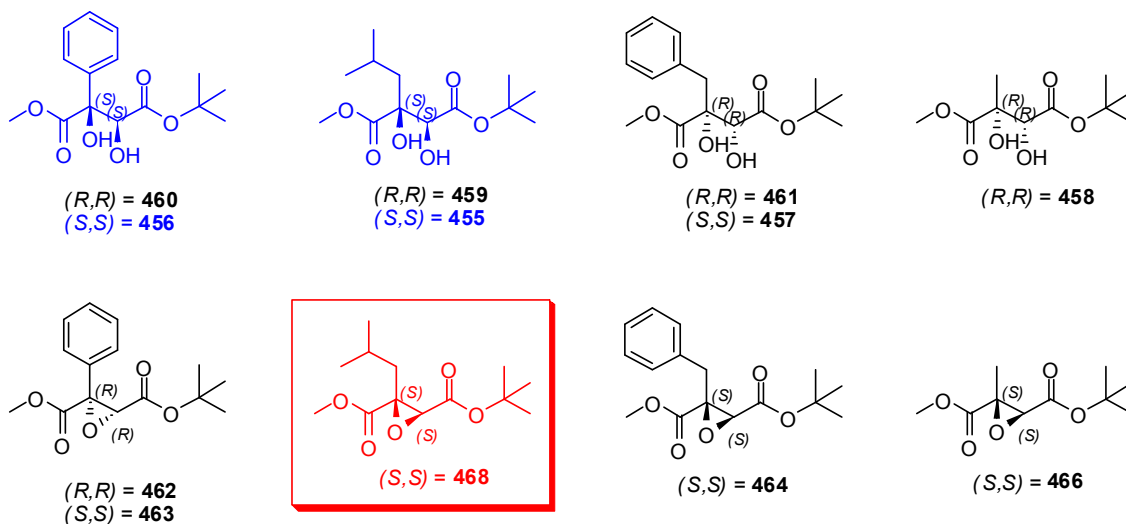


Abbildung 162: Übersicht der auf ihre antibakterielle Aktivität hin untersuchten enantiomerenreinen Intermediaten, (S,S)- bzw. (R,R)-Diol- oder Epoxy-Verbindungen. Die Verbindungen mit signifikanter Aktivität sind in blau, und die aktivste Verbindung **412** in rot dargestellt.

Da das Target der getesteten Verbindungen noch nicht bekannt ist, kann über die strukturellen Anforderungen bzw. Zusammenhänge nur spekuliert werden. Auffällig und besonders hervorzuheben sind die Testergebnisse des *E*-konfigurierte Alken- β -Fluor-Ala-Derivats (**412**) die bei weitem die Hemmwerte der anderen getesteten Verbindungen übersteigt. Der direkte Vergleich mit dem strukturanalogen bzw. inaktiven (*E*)-Alken-Ala-Derivat (**404**) macht nochmals deutlich, dass die signifikante Aktivität von **412** auf das β -ständige Fluoratom zurückzuführen ist (Tabelle 20). Desweiteren konnte eine Bevorzugung der (*E*)- über der (*Z*)- bzw. (S,S)- über der (R,R)-Konfiguration gegen die meisten Erreger beobachtet werden. Die getesteten Verbindungen weisen fast ausschließlich ein antibakterielles Potential gegenüber den Gram-positiven Bakterien auf. Bezüglich des Gram-negativen *E. coli* wurden keine signifikanten bzw. physiologisch relevanten Wachstumshemmungen gefunden. Gegen *S. aureus* verhielt es sich ähnlich wie für *E. coli*, wobei für zwei Testverbindung, das (*Z*)-Alken-Trp (**436**), und das (*rac*)-Epoxy-Chg (**443**) ein schwaches antibakterielles Potential gegenüber *S. aureus* nachgewiesen wurde.

Tabelle 20: Hemmhofdruchmesser [cm] der synthetischen Intermediate im antibakterielle Screening: Rot unterlegt sind die Hemmhofdruchmesser [cm] der aktivsten Verbindungen. Gelblich unterlegt sind die Hemmhofdruchmesser [cm] der mäßig aktiven, und bräunlich die Verbindungen welche zwar antibakterielle Aktivitäten aufwiesen (10mg/ml), jedoch erst ab physiologisch irrelevanten Konzentrationen.

Hemmhof Durchmesser [cm]	<i>B. subtilis</i>			<i>E. coli</i>			<i>M. phlei</i>			<i>S. aureus</i>		
Verbindung	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
452	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
450	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
444	-	0,9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
446	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
443	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9
448	-	-	0,9	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
423	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
431	-	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
407	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
411	-	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
413	-	1	1	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
426	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
433	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
416	-	0,9	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
428	-	0,9	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
425	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
421	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
422	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
437	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
436	-	-	-	-	-	-	-	0,8	0,9	-	0,8	0,9
419	0,8	0,9	0,9	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
404	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
424	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
412	0,9	1,4	1,7	-	-	0,9	-	0,9	1,2	-	-	-
406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
408	-	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
415	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
455	-	-	-	-	-	0,9	-	-	0,8	-	-	-
456	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-
457	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
463	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
464	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
462	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
466	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
468	0,7	0,9	1	-	-	-	-	0,8	0,8	-	-	-
458	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
461	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
459	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
460	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
DMSO 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apramycin	1,5	n.b.	n.b.	1,7	n.b.	n.b.	2,0	n.b.	n.b.	1,4	n.b.	n.b.
Chloramphenicol	2,5	n.b.	n.b.	1,7	n.b.	n.b.	1,5	n.b.	n.b.	1,8	n.b.	n.b.
Kanamycin	1,8	n.b.	n.b.	1,9	n.b.	n.b.	2,4	n.b.	n.b.	1,7	n.b.	n.b.
Tetracyclin	3	n.b.	n.b.	2,3	n.b.	n.b.	2,1	n.b.	n.b.	2,2	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt;

Welches Target im Zuge der antibakteriellen Wirkung adressiert wird, ist wie schon erwähnt bislang nicht geklärt, hierzu sind zukünftige detailliertere Studien erforderlich. Einerseits ist eine Wechselwirkung mit der bakteriellen Zellwand denkbar, hierbei kann es wie im Fall von Fosfomycin als irreversibler Hemmstoff von MurA (Cysteinprotease) die Mureinbiosynthese verhindern, oder nach Penetration der Bakterienwand innerhalb der Zelle zu irreversiblen Reaktion cysteinhaltiger Proteasen kommen. Dies ist besonders im Falle der fluorierten Verbindung, (*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**412**) interessant, da sie die größte Aktivität bezüglich den Gram-positiven Keimen *B. subtilis* und *M. phlei* aufwies. Die Darstellung neuer fluorierter elektronenarmer Verbindungen (Alken bzw. Epoxy) wäre in diesem Zusammenhang genauso sinnvoll wie postfermentative Modifikationen des Naturstoffes Fosfomycin (**627**) mittels Einführens eines oder mehrerer Fluorsubstituenten am Oxiranring der Verbindung.

4.4.1.1.1 Antibakterielles Screening der synthetischen Intermediate gegen *Bacillus subtilis* und *Mycobacterium phlei*

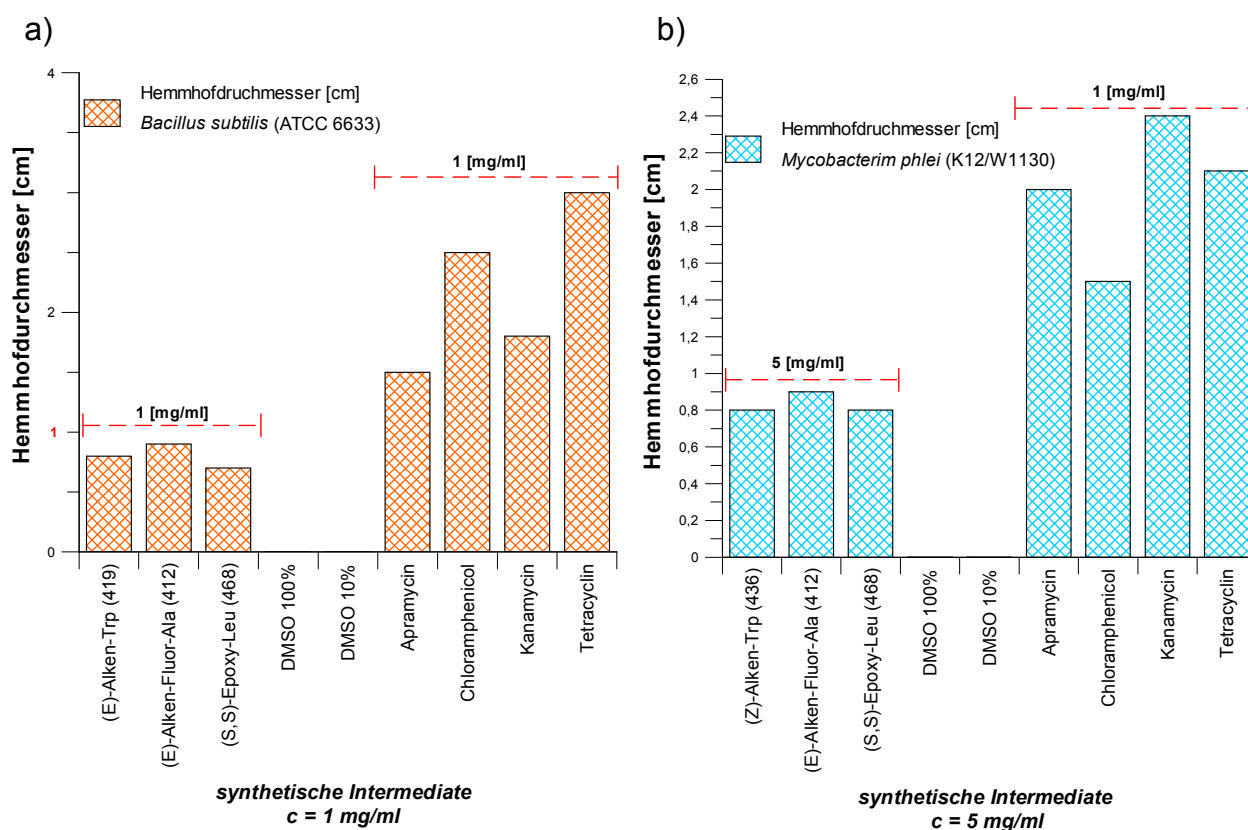


Abbildung 163: Graphische Darstellung der Hemmhoft diameter [cm]; a) synthetische Intermediate ($c = 1 \text{ mg/ml}$) gegen *B. subtilis*; b) synthetische Intermediate ($c = 5 \text{ mg/ml}$) gegen *M. phlei*. Ausschließlich drei Verbindungen: (*E*)-Alken-Trp (**419**), (*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**412**) und (S,S)-Epoxy-Leu (**468**) zeigten eine deutliche Aktivität.

4.4.1.2 Antibakterieller Testierung der Tripeptide

Aufgrund der unerwarteten antibakteriellen Aktivitäten der getesteten, synthetischen Intermediate sollten die daraus dargestellten *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide bezüglich ihrer Aktivität in einem analogen antibakteriellen Screening untersucht werden. In Abbildung 164 ist die Auswahl der getesteten *E64c*- und *CA028-like*-Peptide dargestellt. Die im vorherigen Abschnitt besprochenen synthetischen Intermediate wurden hierzu auf zwei unterschiedliche Dipeptidmotive, entweder *E64c-like* (Isopentylamid-Leu) oder *CA028-like* (Pro-Ile) gekuppelt. Bei Betrachtung der in Tabelle 21 aufgeführten Wachstumshemmungen wird schnell ersichtlich, dass fast ausschließlich die *CA028-like*-Peptide eine antibakterielle Aktivität gegen die getesteten Keime aufweisen. Die *E64c-like*-Peptide zeigten keinerlei Aktivitäten gegenüber dem Gram-negativen *E. coli* und Gram-positiven *S. aureus*.

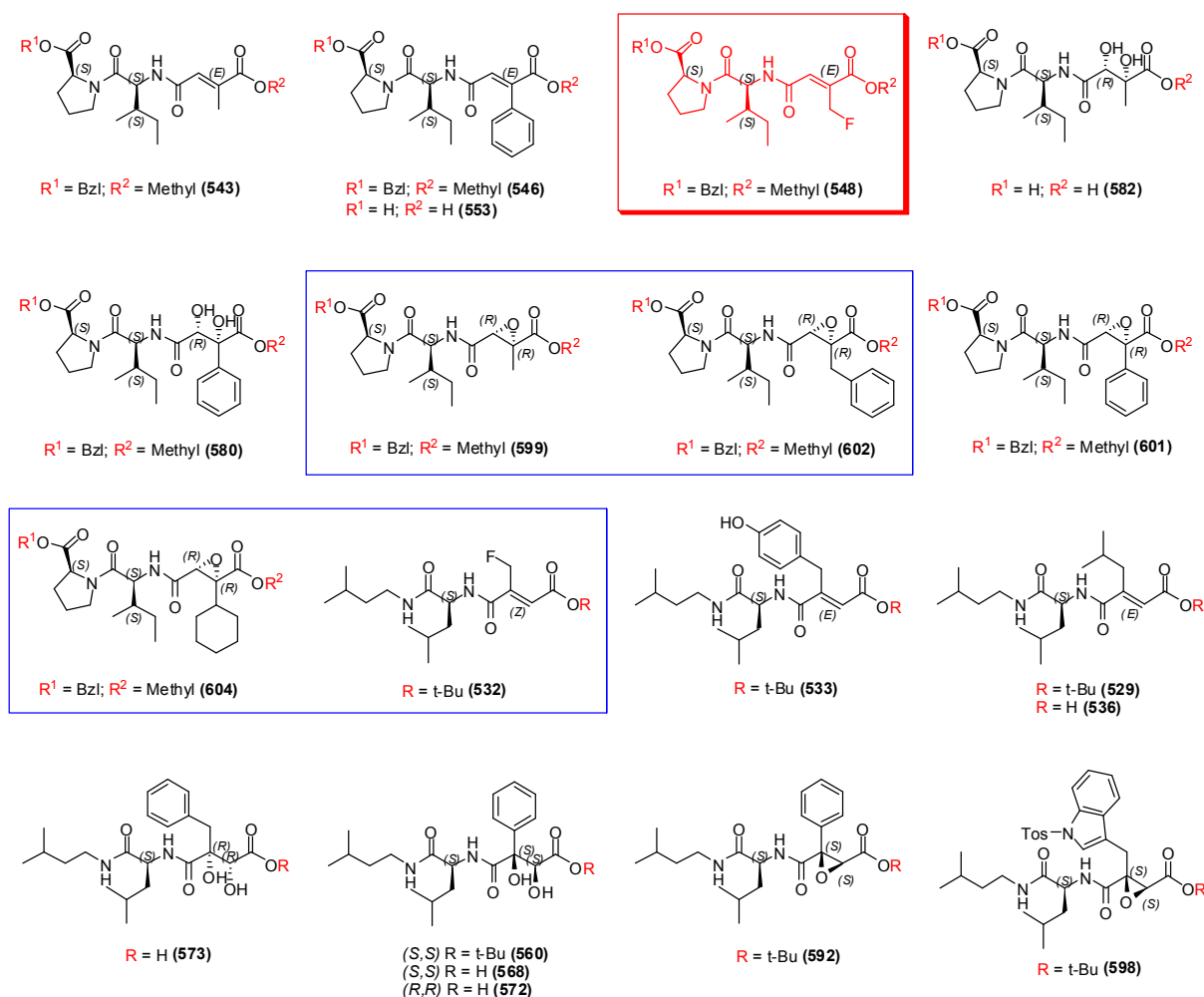


Abbildung 164: Übersicht der für die antibakterielle Testierung bereitgestellten *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide. Die aktivste Verbindung, *CA028-like*-(*E*)-Alken-β-Fluor-Ala (548) ist rot dargestellt, und die mäßig aktiven Epoxy-Peptide sind in blau gerahmt.

Tabelle 21: Hemmhofdruchmesser [cm] ausgewählter *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide im antibakterielle Screening: Rot unterlegt sind die Hemmhofdruchmesser [cm] der aktivsten Verbindungen. Gelblich unterlegt sind die Hemmhofdruchmesser [cm] der mäßig aktiven, und bräunlich die der zwar antibakterielle aktiven Verbindungen (10mg/ml), jedoch erst ab physiologisch irrelevanten Konzentrationen.

Hemmhof Ø [cm]	<i>B. subtilis</i>			<i>E. coli</i>			<i>M. phlei</i>			<i>S. aureus</i>		
Verbindung	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
529	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
532	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
568	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
592	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
572	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
573	-	-	-	-	-	-	-	0,9	1,0	-	-	-
598	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
546	-	0,8	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
553	-	-	-	-	-	1,0	-	0,9	1,0	-	-	-
548	2,7	3,0	> 3,0	-	-	-	-	0,9	1,0	2	3	3,5
580	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
582	-	1,0	1,3	-	0,8	0,9	0,8	1,0	1,1	-	-	1,3
599	-	1,1	1,4	-	1,0	1,5	0,8	1,0	1,5	-	-	1,5
602	-	1,3	1,5	-	1,0	1,5	0,9	1,0	1,2	-	1,0	1,5
604	-	1,0	1,3	-	0,8	1,7	0,8	1,0	1,1	-	-	1,2
543	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
601	-	0,8	1,2	-	-	1,1	-	0,9	1,1	-	-	-
DMSO 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apramycin	2,7	n.b.	n.b.	1,7	n.b.	n.b.	2,0	n.b.	n.b.	1,5	n.b.	n.b.
Chloramphenicol	2,8	n.b.	n.b.	2,2	n.b.	n.b.	1,5	n.b.	n.b.	2,8	n.b.	n.b.
Kanamycin	2,9	n.b.	n.b.	2,1	n.b.	n.b.	2,3	n.b.	n.b.	1,8	n.b.	n.b.
Tetracyclin	2,8	n.b.	n.b.	2,0	n.b.	n.b.	2,2	n.b.	n.b.	3,0	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Eine geringfügige wenn auch kaum erwähnenswerte Aktivität der *E64c-like*-Peptide konnte hinsichtlich *M. phlei* beobachtet werden (Tabelle 21). Interessanterweise handelte es sich hierbei um das *E64c-like*-(S,S)-Diol-Phg (**568**) und -(R,R)-Phe (**573**) sowie das -(S,S)-Epoxy-Phg (**592**), deren synthetische Vorläufer (s. Abschnitt 4.4.1.1) auch schon aktiv waren. Interessant ist auch, dass von den getesteten *E64c-like*-Peptiden ausschließlich, wenn auch nur schwach die fluorierte Verbindung, *E64c-like*-(E)-Alken-β-Fluor-Ala (**532**) eine Wachstumshemmung gegen *B. subtilis* aufwies, im direkten Vergleich zu den *CA028-like*-Peptiden jedoch als inaktiv zu bewerten sind. Bei genauerer Betrachtung der antibakteriellen Aktivitäten bezüglich des Gram-positiven Erregers *B. subtilis* ist ersichtlich, dass das fluorierte Derivat, *CA028-like*-(E)-Alken-β-Fluor-Ala (**548**) die größte Aktivität aufweist (Tabelle 21). Die für **548** (c = 1 mg/ml) bestimmten Hemmhofdurchmesser entsprechen denen der getesteten Referenzantibiotika. Bei den weiteren aktiven *CA028-like*-Tripeptiden

(599, 602, 604, 601) handelt es sich hauptsächlich um (*R,R*)-Epoxy-Peptide, wobei diese erst ab einer Konzentration von 5 mg/ml aktiv waren. Interessanterweise konnte keine Aktivität von 548 hinsichtlich des Gram-negativen *E. coli* beobachtet werden, wobei die CA028-like-Epoxy-Peptide (599, 602, 604, 601) ähnlich aktiv waren wie gegen *B. subtilis* (Abbildung 165).

4.4.1.2.1 Antibakterielles Screening der E64c- und CA028-like-Tripeptide gegen *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*

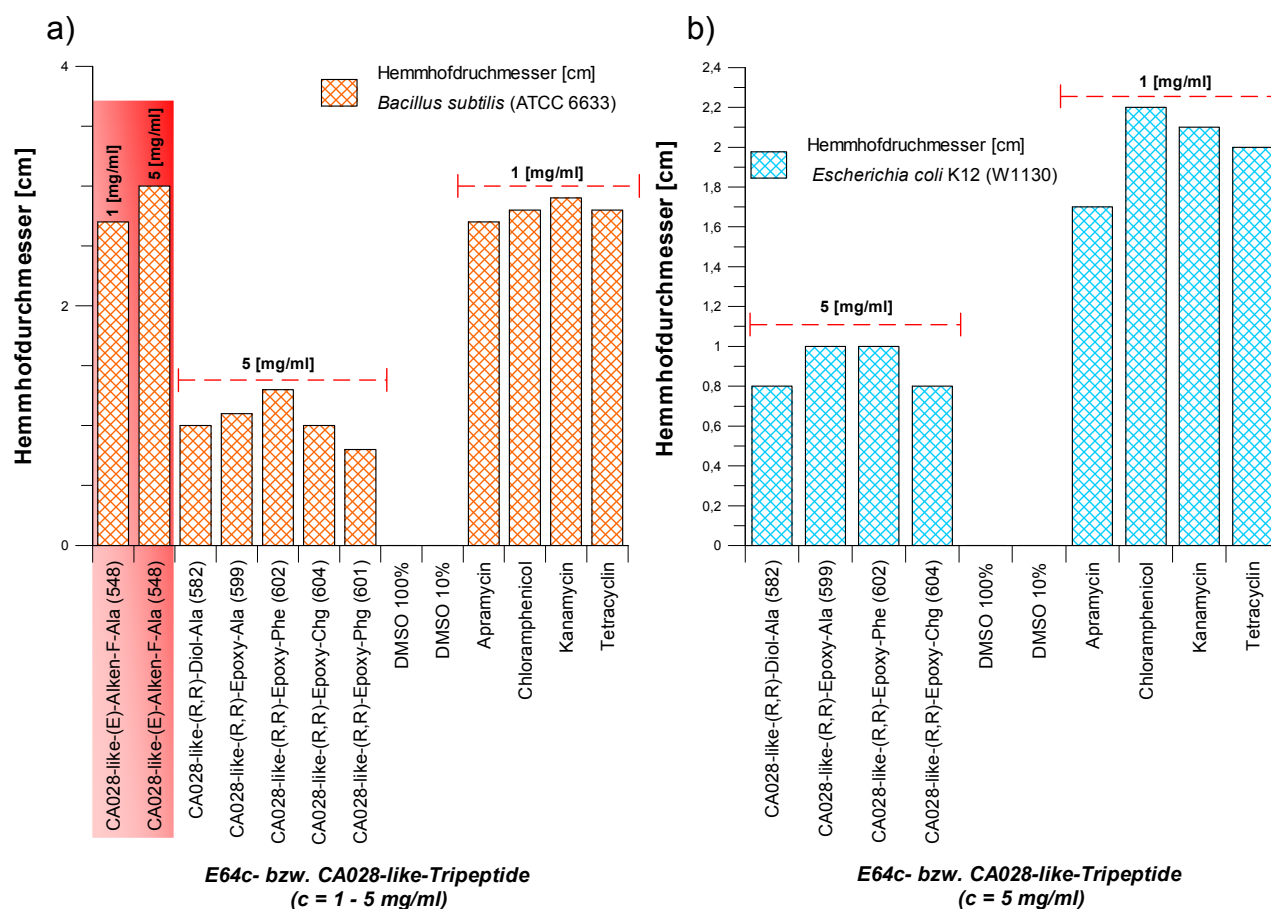


Abbildung 165: Graphische Darstellung der Hemmhofdurchmesser [cm]; a) CA028-like-Tripeptide (c = 1 mg/ml) gegen *B. subtilis*; b) CA028-like-Tripeptide (c = 5 mg/ml) gegen *E. coli*. Ausschließlich drei Verbindungen: CA028-like-(E)-Alken-Trp- (419), -(E)-Alken-β-Fluor-Ala- (412) und -(S,S)-Epoxy-Leu-Peptid (468) zeigten eine deutliche Aktivität, wobei nur für 412 eine signifikante Steigerung der Wachstumshemmung infolge einer Konzentrationserhöhungen gefunden wurde.

Die Testergebnisse der CA028-like-Tripeptide hinsichtlich des Gram-positiven Erregers, *M. phlei* (Abbildung 166) zeigen hingegen eine deutliche Aktivitätssteigerung der (*R,R*)-Epoxy-

Peptide, wobei auch das (*R,R*)-Diol-Ala-Peptid (**582**) eine signifikante Hemmung aufweist. Das fluorierte CA028-like-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**548**) war auch gegen *M. phlei* aktiv, aber nicht vergleichbar zu den gegen *B. subtilis* bestimmten Wachstumshemmungen. Die CA028-like-(*R,R*)-Epoxy-Peptide (**599**, **602**, **604**) waren gegenüber dem Gram-negativen *S. aureus* nur schwach, und erst ab der 10-fachen Konzentration der getesteten Referenzantibiotika aktiv. Umso herausragender ist die beachtliche Aktivität von **548** gegenüber *S. aureus*, mit Hemmhöfen größer oder zumindest denen der getesteten Referenzantibiotika entsprechend (Abbildung 166).

4.4.1.2.2 Antibakterielles Screening der E64c- und CA028-like-Tripeptide gegen *Mycobacterium phlei* und *Staphylococcus aureus*

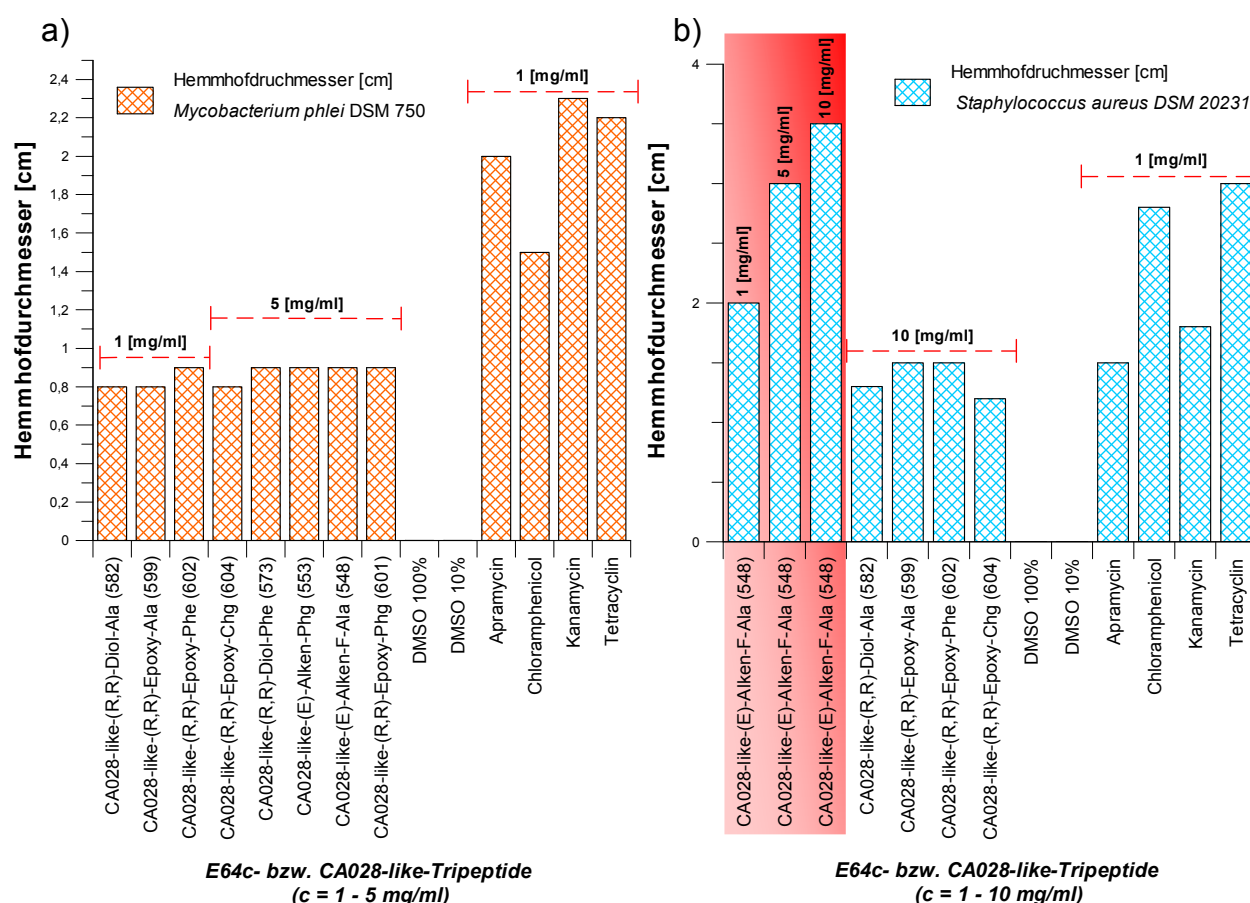
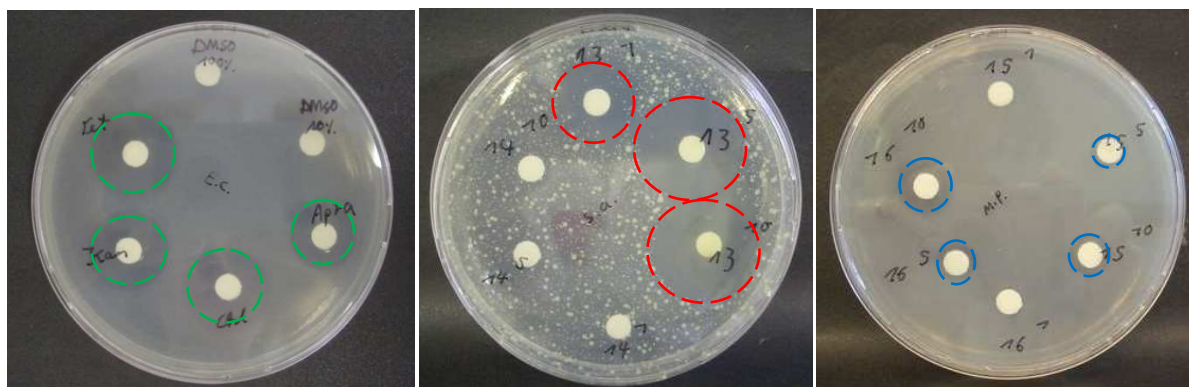


Abbildung 166: Graphische Darstellung der Hemmhofdurchmesser [cm]; a) CA028-like-Tripeptide ($c = 1\text{--}5$ mg/ml) gegen *M. phlei*; b) CA028-like-Tripeptide ($c = 5$ mg/ml) gegen *S. aureus*. Die aktivste Verbindung gegen *S. aureus*, CA028-like-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**412**) ist rot unterlegt dargestellt. Ausschließlich für **412** wurde eine signifikante Aktivitätszunahme in Verbindung mit einer Konzentrationserhöhung beobachtet.

Abgesehen von den *CA028-like*-(*R,R*)-Epoxy-Peptiden (**599**, **602**, **604**) ist das *CA028-like*-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala-Derivat (**548**) das einzig antibakteriell aktive Tripeptid gegen *S. aureus*. In Abbildung 166 sind die Hemmhofdurchmesser von **548** im direkten Vergleich zu den Referenzantibiotika wiedergegeben. Von allen getesteten Verbindungen sowohl den synthetischen Intermediaten (s. Abschnitt 4.4.1.1) als auch der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide ist das *CA028-like*-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**548**) die aktivste und strukturell interessanteste. Während des antibakteriellen Screenings der synthetischen Intermediate viel schon das fluorierte (*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**412**) aufgrund seiner signifikanten Aktivität gegenüber den Gram-positiven Keimen, *B. subtilis* und *M. phlei* auf. Die enorme Zunahme der Aktivität, sowie die selektive Wirkung von **548** bezüglich der getesteten Gram-positiven Erreger kann hauptsächlich auf das *CA028-like*-Peptidmotiv zurückgeführt werden. Der direkte Vergleich mit *E64c-like*-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**532**), untermauert diese Theorie noch zusätzlich, da **532** mit Ausnahme von *B. subtilis* keinerlei antibakterielle Aktivität aufweist.



Die Nummerierung der Verbindungen in der Abbildung entsprechen nicht den Verbindungsnummern in dieser Arbeit, daher entspricht: 13 = **548**, 14 = **580**, 15 = **582**, und 16 = **599**. Die Hemmhöfe wurden zusätzlich farblich umrandet.

Abbildung 167: Hemmhofbilder ausgewählter *CA028-like*-Diol- und Epoxy-Peptide. a) Hemmhöfe der Referenzantibiotika: Apramycin (Apra), Kanamycin (Kan), Tetracyclin (Tet), Chloramphenicol (Chl), sowie DMSO (10% und 100%); b) Hemmhöfe von *CA028-like*-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**548**, c = 1, 5, 10 mg/ml); c) Hemmhöfe der schwach aktiven *CA028-like*-Diol- (**582**) und Epoxy-Peptide (**599**, c = 1, 5, 10 mg/ml).

Desweiteren wiesen neben **548** auch strukturell abgeänderte *CA028-like*-Tripeptide signifikante Wachstumshemmungen gegen einzelne Erreger während des antibakteriellen Screenings auf. Über den Wirkmechanismus und das spezifische Target der getesteten *CA028-like*-Tripeptide kann derzeit nur spekuliert werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen auf bereits bekannte Struktur motive aktueller Antibiotika zurückzuführen sind, und nicht die exakte Gesamtstruktur der Tripeptide

dafür ausschlaggebend ist. Hierauf deuten auch die antibakteriellen Aktivitäten einzelner enantiomerenreiner sowie racemischer *CA028-like*-(*S,S*)-, (*R,R*)- bzw. (*rac*)-Diol- und Epoxy-Peptide hin. Dies ist besonders im Fall des fluorierten *CA028-like*-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala-Peptids (**548**) interessant, denn die signifikanten Aktivitäten von **548** gegenüber den Gram-positiven Erregern, *S. aureus* und *B. subtilis* geben Anlass dessen biologische Aktivitäten näher zu untersuchen. Zusätzlich gilt es, das fluorierte synthetischen Intermediat (*E*)-Alken- β -Fluor-Ala (**412**) an randomisierte Peptidmotive zu knüpfen um die pharmakophore aktive Region einzugrenzen bzw. zu optimieren. Die an dieser Stelle gemachten Aussagen sind spekulativ und eine genauere Untersuchung der Wirkmechanismen bzw. des Targets ist daher erforderlich.

4.5 Chemoenzymatische Synthese neuer Hexa- und Octa-Cyclodepsipetide

4.5.1 *In vitro*-Synthese neuer Enniatin-Derivate

Im Screening nach pharmakologisch wirksamen Verbindungen spielt neben der Untersuchung biologischer Proben die Anwendung kombinatorischer Ansätze eine wichtige Rolle. Die Verwendung kombinatorischer Methoden beschränkt sich hauptsächlich auf die Darstellung peptidsynthetischer Bibliotheken, oder nicht-enzymatische Methoden. Das bereits erwähnte Konzept der Vorläufer-dirigierten Biosynthese („*precursor biosynthesis*“) beruht auf der Einfütterung von Substraten in Submerskulturen, die infolge ihrer chemischen Verwandtschaft zu den natürlichen Substraten ebenfalls von den produzierenden Organismus bzw. der daraus isolierbaren Synthetase verarbeitet werden können, wobei modifizierte Produkte entstehen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Synthese von Enniatin möglich ist. Ein möglicher Ansatz für die Darstellung chemoenzymatischer Bibliotheken mit der Enniatinsynthetase (ESyn) beruht auf der geringen Substratspezifität der ESyn (s. Abschnitt 2.7.3). Im Gegensatz zur ribosomalen Proteinbiosynthese, die eine hohe Übereinstimmung zwischen genetischer Information und Stoffwechselprodukt aufweist, akzeptiert die Enniatin-Synthetase verschiedene Substrate. Es existiert kein „proof-reading“, die gebildeten Produkte werden also nicht auf ihre Richtigkeit überprüft. Für die Aminosäurenbindungstelle (EB) konnte über *in vitro*-Experimente mit L-Norvalin, L-Norleucin, und Aminobuttersäure eine verminderte Substratspezifität nachgewiesen werden.^[327] Interessanterweise zeigt auch das Modul EA, die α -D-Hydroxysäuren-bindungsstellen eine verminderte Substratspezifität welche mit D-Lactat, D-2-Hydroxy-3-

methyl-*n*-valeriansäure, D-2-Hydroxy-*n*-valeriansäure, D-2-Hydroxybuttersäure und D-Hydroxyisobuttersäure von Krause *et al.* nachgewiesen wurde.^[328] Da die von Krause *et al.* getesteten Verbindungen ausschließlich auf kommerziell erhältlichen aliphatischen D-Hydroxysäuren beruhen, und es sich hierbei eher um ein begrenztes Spektrum unterschiedlicher Verbindungen handelte, konnten auf der Basis dieser Ergebnisse keine fundierten Aussagen bezüglich der Substratspezifität und des dreidimensionalen Aufbaus der Hydroxysäurenbindungsstelle gemacht werden. Eine genaue Untersuchung der D-Hydroxysäurenbindungsstelle, sowie die chemoenzymatische Synthese neuer Enniatin-Derivate sollte auf der Basis einer Bibliothek von 30 unterschiedlichen α -D-Hydroxysäuren erfolgen (s. Abschnitt 4.1.1).

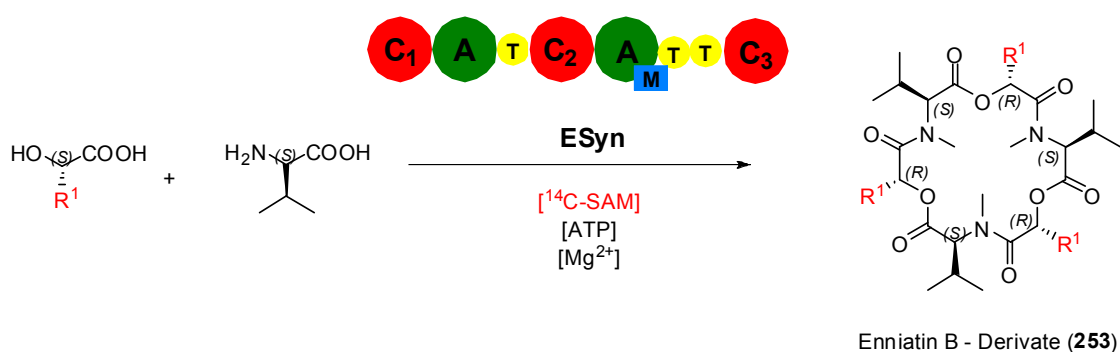


Abbildung 168: Experimenteller Aufbau der Chemoenzymatischen Synthese neuer Enniatin-Derivate. Verwendete Komponenten für den *in vitro*-Assay mit der Enniatin-Synthetase (ESyn). R¹ steht für die eingeführten Substitutionsmuster der synthetischen α -D-Hydroxysäuren (s. Abbildung 169).

In Kooperation mit PD Dr. Rainer Zocher[†] (TU Berlin, Institut für Chemie, Arbeitskreis Biochemie und Molekularbiologie) wurden die *in vitro*-Versuche zu den Enniatin-Derivaten durchgeführt. Die HPLC-ESI-MS/MS Messungen der neuen Verbindungen wurden von Dr. Timo Schmiederer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roderich Süßmuth durchgeführt. Für die *in vitro*-Synthese wurde ESyn, mit L-Val, ATP, ¹⁴C-SAM, und einer entsprechenden α -D-Hydroxysäure in millimolaren Konzentration inkubiert (s. Abbildung 168).^[viii] Unter Substratsättigungsbedingungen der Enniatin-Synthetase, konnten die Anfangsgeschwindigkeiten (v_i) und infolge dessen die k_{cat} -Werte für jede einzelne α -D-Hydroxysäure bestimmt werden. Die radioaktivmarkierten Enniatin-Derivate wurden mit EtOAc extrahiert und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. In Abbildung 170 ist am Beispiel von „Chlor“-Enniatin die prinzipielle Analyse eines solchen Experiments dargestellt. Die Bildung der natürlichen und der neuen Enniatin-Derivate wurde jeweils mit LC-MS-Analytik nach-

^[viii] für Details s. experimenteller Teil dieser Arbeit.

gewiesen. Eine weiterführende Charakterisierung der Enniatine erfolgte mittels MS/MS-Analytik. In Abbildung 169 sind die relativen k_{cat} -Werte der Umsetzung der α -D-Hydroxysäuren-Derivate mit der Enniatin-Synthetase (ESyn) im direkten Vergleich zu dem natürlichen Substrat D-Hiv (**266**), das auf 100% gesetzt wurde dargestellt. Wie anhand der k_{cat} -Werte zuerkennen ist, gestattet die Hydroxysäurenbindungsstelle der ESyn ein breites Spektrum modifizierter α -D-Hydroxysäuren. Eine Substitution der Isopropylseitenkette des natürlichen Substrats D-Hiv (**266**) durch Ethyl (**259**) oder Chlormethyl (**272**) wurde ohne Aktivitätsverlust sehr gut toleriert. Der Ersatz von Chlor (**272**), durch Brom (**273**; 40%) bzw. Fluor (**271**; 14%) führten zu einer sukzessiven Abnahme der ESyn-Aktivität. Eine Verkürzung der Ethyl-Seitenkette von **259** (100%) zu Methyl (**258**; 10%) führten zu einem drastischen Aktivitätsverlust der Synthetase.

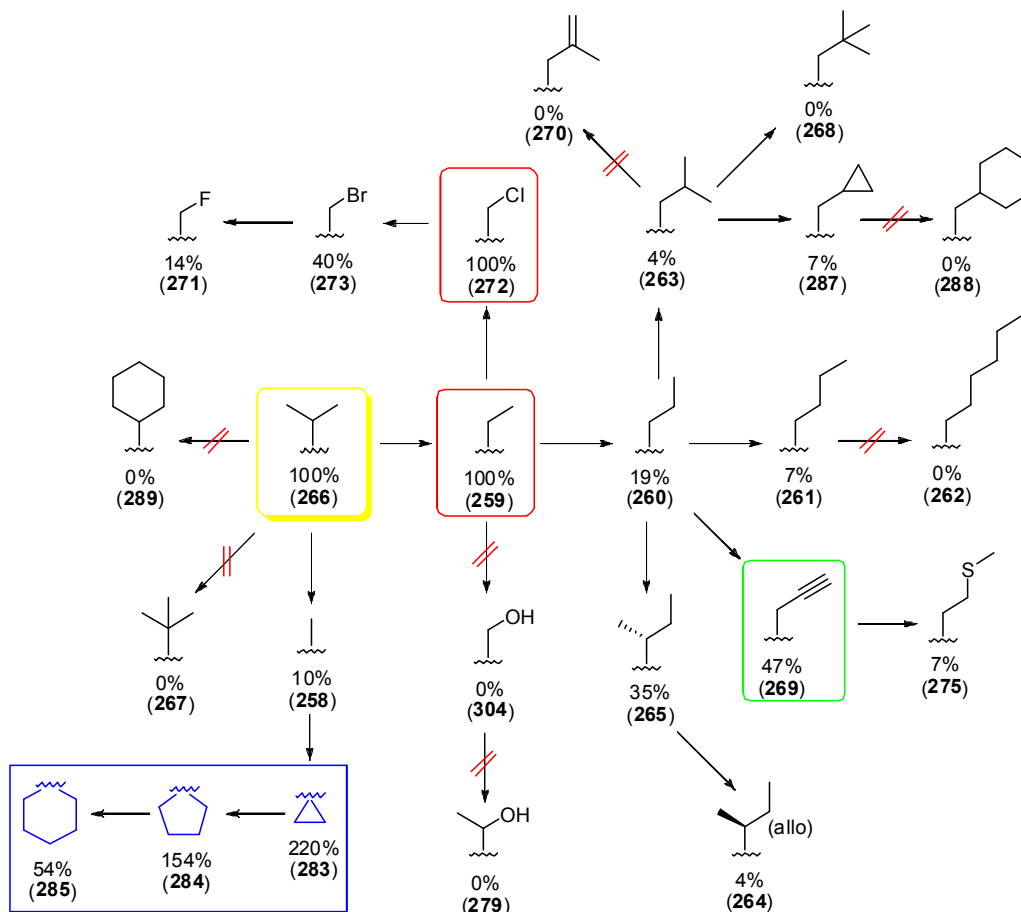


Abbildung 169: Schematische Darstellung der prozentualen k_{cat} -Werte der ESyn (natürliches Substrat D-Hiv (**266**) $4.1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} = 100\%$) bezüglich der Einbauraten der synthetischen α -D-Hydroxysäuren. Das natürliche Substrat ist gelb und die synthetischen Derivate mit identischen k_{cat} -Werten rot, sowie die Alkin-Verbindung in grün und die quartären Verbindungen in blau dargestellt.^[275]

Der Austausch des β -ständigen Wasserstoffs des natürlichen Substrats D-Hiv (**266**) durch eine zusätzlich verzweigende Methylgruppe von **267** (0%) hatte einen totalen Aktivitätsverlust zur Folge. Kettenverlängerungen ausgehend von **259** hin zu *n*-Propyl (**260**) über *n*-Butyl (**261**) bis hin zu *n*-Hexyl (**262**) führten zu einem sukzessiven Aktivitätsabfall (19%, 7% und 0%). Auffällig war jedoch, dass das Alkin-Derivat (**269**; 47%) im direkten Vergleich zu der korrespondierenden gesättigten Verbindung (**260**; 19%) deutlich besser von der ESyn akzeptiert wurde.

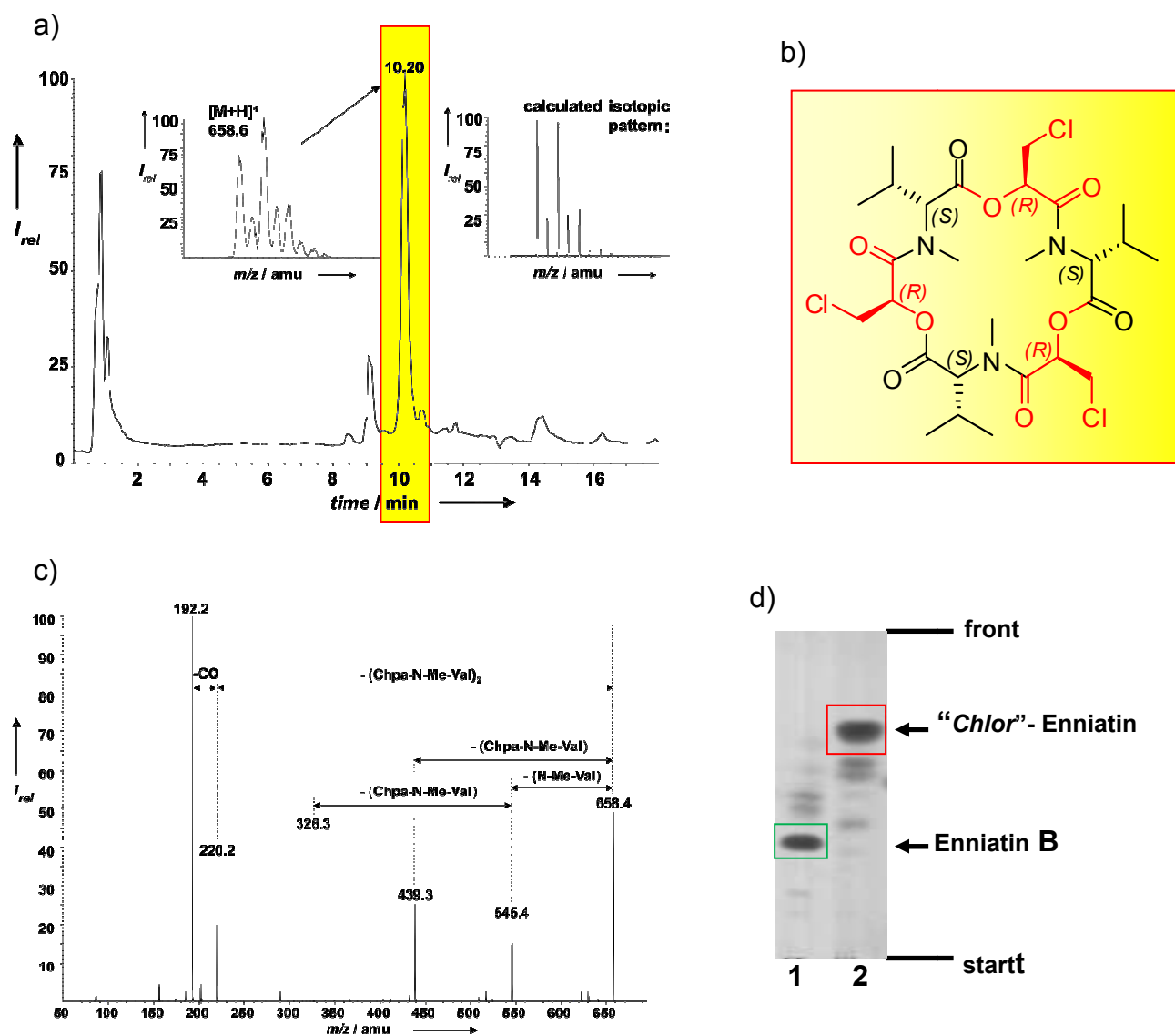


Abbildung 170: *In vitro*-Synthese von „Chlor“-Enniatin mittels der Enniatin-Synthetase (ESyn) und α -D-Hydroxy- β -chlor-lactat (**272**); a) HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von „Chlor“-Enniatin; b) Strukturformel von „Chlor“-Enniatin; c) MS/MS-Spektrum der Verbindung; d) Autoradiogramm der DC-Trennung von natürlichen Enniatin B (1. Spur) und „Chlor“-Enniatin (2. Spur).^[275]

Eine Aufweitung des Rings, in Form eines Cyclohexyl-Derivats (**289**) hatte einen kompletten Aktivitätsverlust zur Folge. Die Substitution an C-3 des natürlichen Substrats (**266**) in Form eines Cyclohexyl-Rests (**288**, 0%) wurde nicht von der Enniatin-Synthetase toleriert. Unpolar verzweigte α -D-Hydroxysäuren wurden von der ESyn nur mäßig akzeptiert wie am Beispiel der *sec*-Butyl-Seitenkette von **265** (35%) mit einer (*R,R*)-Konfiguration zusehen ist. Wohingegen die korrespondierende (*R,S*)-Konfiguration von **264** (4%) ausgehenden von *allo*-Isoleucin praktisch nicht umgesetzt wurde. Ein schrittweise Vergrößerung des sterischen Anspruchs in 3-Position von **266**, in der Reihenfolge *n*-Propyl (**260**), Isobutyl (**261**) und Neopentyl (**262**) führen zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität (**260**; 19%, **261**; 4%), oder keiner Produktbildung (**262**). Polare (**279**, **304**) ionischen (**280**), oder aromatische bzw. heterozyklische α -D-Hydroxysäuren-Seitenketten (**290-292**, **296**, **292**, **305**, **307**) wurden prinzipiell nicht von der Enniatin-Synthetase akzeptiert (Abbildung 171).

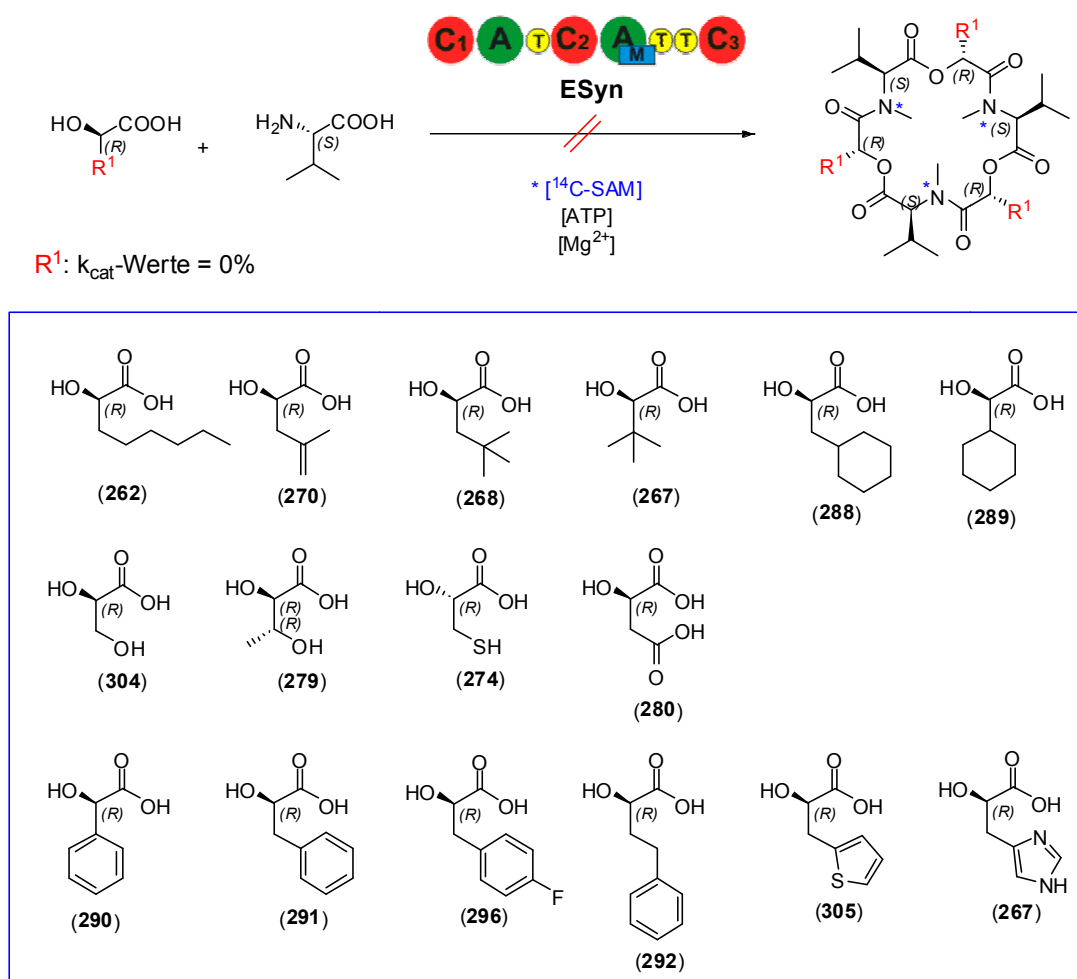


Abbildung 171: Strukturelle Übersicht der α -D-Hydroxysäuren welche im Zuge der *in vitro*-Synthese mit ESyn nicht akzeptiert wurden. Es wurden keine aromatischen, polaren, ionischen, heterozyklischen oder stark verzweigten Seitenketten akzeptiert.^[275]

Die *in vitro*-Ergebnisse der quartär-substituierten Hydroxysäuren (**283-285**) werden hier nur kurz unter Vorbehalt besprochen, da eine Produktbildung mit DC und Autoradiogramm zwar nachweisbar war, aber die entsprechenden Molekülmassen- bzw. Fragmentierungsmuster nicht in Übereinstimmung mit den erwarteten Werten lagen. Erstaunlicher Weise lagen die prozentualen k_{cat} -Werte der Cyclopropyl- (**283**; 220%) und Cyclopentyl-Verbindung (**284**; 154%) weit über denen des natürlichen Substrats (**266**). Eine mögliche Begründung hierfür könnten die während der *in vitro*-Synthese von PF-Derivaten beobachteten Bildungen von Diketomorpholinen (**628**) und Tetradepsipeptiden (**629**) sein (Abbildung 172). Während der Umsetzung der quartären Hydroxysäuren (**283-285**) mit der ESyn zu den entsprechenden Dipeptidol-Einheiten, könnte eine vorzeitige Abspaltung vom Enzym zu den Di- oder Tetrapeptiden führen, welche ihrerseits in die entsprechenden Diketomorpholine oder Tetradepsipeptide umgesetzt werden. Diese Hypothesen wurden bisher nicht durch NMR oder MS nachgewiesen.

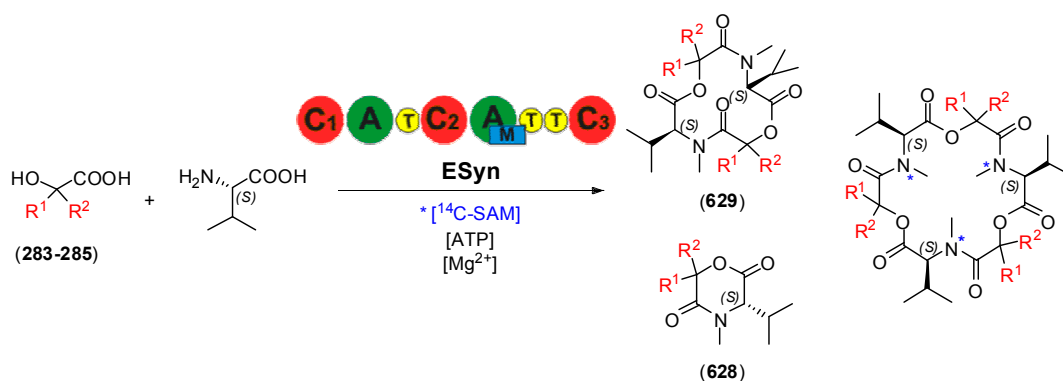


Abbildung 172: *In vitro*-synthetische Bildung von Diketomorpholinen (**628**) und Tetradepsipeptiden (**629**) im Zuge der *in vitro*-Synthese (ESyn) mit den quartären Hydroxysäuren (**283-285**).

Die in Abbildung 169 dargestellten Daten (k_{cat} -Werte) deuten auf eine asymmetrische Organisation der D-Hydroxysäurenbindungstasche des EA-Moduls der ESyn hin, welche sich aus zwei hypothetischen Cavernen zusammensetzt. Die sog. Caverne A, bildet räumlich eine Schleife die aufgrund ihrer sterischen Beschränkung ausschließlich kleinere Substituenten in der 2-Position akzeptieren bzw. beherbergen kann, wie z.B. eine Methylgruppe. Hydroxysäureseitenketten die diese Größe in der 2-Position überschreiten wie Cyclohexyl (**289**) oder *tert*-Butyl (**267**) werden nicht vom Enzym akzeptiert. Caverne B ist in der Lage größere und längere Seitenketten zu beherbergen, was aber mit einem zunehmenden Aktivitätsverlust einhergeht, wie anhand der Hydroxysäureseitenketten von **259** (100%), **260** (19%), **261** (7%) und **262** (0%) zu sehen ist. Mehrfachsubstitutionen in der 3-Position in Form von **263** (4%) oder **268** (0%) führen zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Cyclische Systeme in der 3-Position wurden nur bedingt akzeptiert, wobei

das Cyclopropyl-Derivat **287** (7%) nur sehr langsam, und das sterisch anspruchsvollere Cyclohexyl-Derivat **288** (0%) nicht mehr vom Enzym umgesetzt wurden. Unter drastischem Aktivitätsverlust wird in den Seitenketten der α -D-Hydroxysäuren ein Cyclopropyl (**287**) in der 3-Position bzw. Schwefel (**275**) in der 4-Position noch vom Enzym toleriert. Wie anhand der in Abbildung 171 dargestellten α -D-Hydroxysäuren zu entnehmen ist wurden keine aromatischen, heterozyklischen oder polaren/ionischen Reste in 2- oder 3-Position toleriert. Die gemachten Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die beiden Cavernen A und B hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut sind und daher keine polaren oder geladenen Funktionalitäten tolerieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Enniatin-Synthetase (ESyn) eine bis heute unbekannte, breite Substrattoleranz hinsichtlich einer beachtlichen Anzahl von α -D-Hydroxysäuren aufweist. Desweiteren war es möglich ein umfangreiches Spektrum neuer Enniatin-Derivate mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen darzustellen. Durch die Inkorporation von Brom- (**273**) oder Chlor-Lactat (**272**) können die entsprechenden Enniatin-Derivate durch postbiosynthetische Reaktionen weiter funktionalisiert werden. Noch interessanter gestalten sich die synthetischen Möglichkeiten bezüglich dem eingeführten Alkin-Derivat (**269**), dass basierend auf einem breiten Spektrum an postbiosynthetischen Reaktionen wie z.B. Cycloaddition, Hydroxylierung,^[247] Click-Chemie^[383,384] oder Sonogashira-Kupplung^[385-387] weiter modifiziert werden kann. Die Übertragung der bisherigen Ergebnisse auf eine mutasynthetische Anwendung^[273] muss in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden. Die Darstellung ausreichender Substanzmengen der Enniatin-Derivate ist der nächste Schritt für eine umfangreiche Charakterisierung ihrer Bioaktivitäten.

4.5.2 *In vitro*-Synthese neuer PF-1022 A-Derivate

Wie schon in den vorhergehenden Abschnitten 2.6.1 und 2.6.2 erwähnt wurde, begründet sich die Wirkung der PF-Derivate gegen Nematoden vermutlich auf eine homologe Wirkung des α -Latrotoxins (Gift der schwarzen Witwe). Wie von Seager *et al.*^[388] und Harder *et al.*^[389] gezeigt kommt es aufgrund der Interaktion des PF-Derivats mit einem Latrophilin-like-Rezeptor (HC110-R) zu einer induzierten Calcium-Ausschüttung, die wiederum für die Muskelparalyse der Nematoden verantwortlich ist. Desweiteren scheinen die PF-Derivate bei einzelnen Nematoden die Eiablage als auch deren Mobilität zu inhibieren. Die Wirkung der PF-Verbindungen auf unterschiedlichste Nematoden-Stämme beruht auf ihrer Toxizität gegenüber diesen Organismen, wobei keine toxischen Reaktionen beim Wirt auftreten. Diese Eigenschaften sowie die interessante pharmakophore Molekülstruktur machen die PF-Verbindungen zu außergewöhnlichen Kandidaten für die Weiterentwicklung neuer strukturell

modifizierter PF-Derivate für die Medikamentenentwicklung für Haus- und Nutztiere. Die Natur der Hydroxysäurenbindungsstelle zu untersuchen, ist ferner von großem Interesse für biochemische Anwendungen sowie für phylogenetische Studien.

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war wie auch schon bei der Enniatin-Synthetase (ESyn) die Untersuchung bzw. Charakterisierung der Substratspezifität der PF-Hydroxysäuren-Bindungsstelle, sowie die *in vitro*-Synthese neuer PF1022-Derivate, welche als potentielle Wirkstoffe von hohem biotechnologischen Interesse sind. Enniatine kommen in der Natur hauptsächlich mit kaum variierenden aliphatischen Aminosäuren vor, wie D-Valin (Enniatin B), oder D-Isoleucin (Enniatin A), während die Hydroxysäure D-Hiv (266) stark konserviert vorliegt. Die PF-Derivate werden hauptsächlich anhand ihrer D-Hydroxysäuren unterschieden, wobei die L-Aminosäure Größtenteils konserviert in Form von L-Leucin vorliegt. Der wesentliche Unterschied der PF-Synthetase im Vergleich zu ESyn liegt in ihrer Flexibilität gegenüber aliphatischen als auch aromatische Hydroxysäuren begründet. Basierend auf diesem Umstand können sowohl aliphatische als auch aromatische D-Hydroxysäuren in den Octazyklus der PF-Verbindungen einbaut werden. Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen *in vitro*-Versuche anhand der ESyn zeigten, dass eine gewisse Substrattoleranz bezüglich aliphatischen, halogenierten und kleinen cyclischen D-Hydroxysäurenseitenketten besteht.

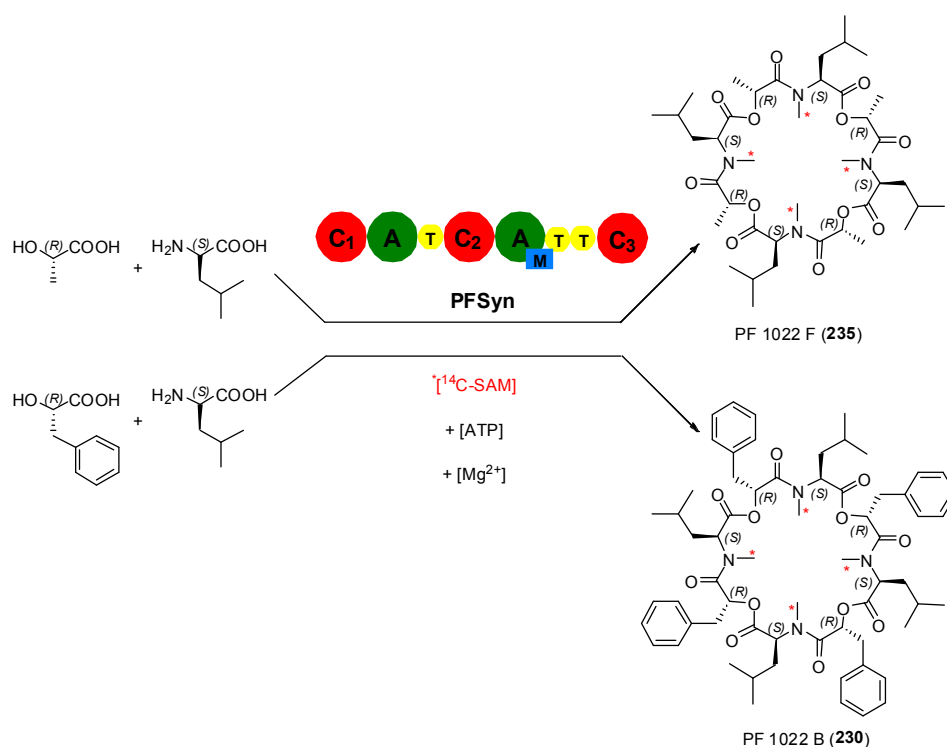


Abbildung 173: *In vitro*-Syntheseprodukte der PF-Synthetase (PFSyn) infolge von D-Lac (PF 1022 F) und D-PheLac (PF 1022 B) in Anwesenheit von L-Leu, ATP, AdoMet. Sketch der PF1022 Synthetase Domänen PFSyn: C (Kondensation), A (Adenylierung), T (Thiolierung), M (Methylierung).

Allerdings kann die Enniatin-Synthetase keine aromatischen α -D-Hydroxysäure-Derivate in den Hexazyklus des Enniatins einbauen. Die PF-Derivate beherbergen hingegen zwei in Größe und chemischen Eigenschaften unterschiedliche α -D-Hydroxysäuren, α -D-PheLac und α -D-Lac (Abbildung 173). Die Benzylseitenkette von D-PheLac stellt einen sterisch anspruchsvollen Rest mit einem delokalisierten aromatischen System (π - π -Wechselwirkungen) dar, wohingegen D-Lac mit seiner relativ kleinen Methylgruppe strukturell und chemisch völlig verschieden ist. Die schon an der Enniatin-Synthetase (ESyn) getestete α -D-Hydroxysäurenbibliothek wurde um eine Vielzahl heterozyklischer und aromatischer Derivate erweitert. In Kooperation mit Frau Dipl.-Chem. Jane Müller (TU Berlin, Institut für Chemie) wurden die *in vitro*-Versuche zu den PF-Derivaten, und die HPLC-ESI-MS/MS Messungen wie auch schon für die Enniatin-Derivate von Dr. Timo Schmiederer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roderich Süßmuth durchgeführt. Die chemoenzymatischen Assays wurden gemäß der von Zocher *et al.* beschriebenen Methode durchgeführt.^[283] Für die *in vitro*-Synthese neuer PF-Derivate wurde ein Set von 40 verschiedenen α -D-Hydroxysäuren (s. Abschnitt 4.1.1 - 4.1.5) auf ihre Eignung als Substrat getestet. Dazu wurde ein PFSyn-Rohsaft hergestellt und mit ATP, MgCl_2 , L-Leucin, ^{14}C -AdoMet (2.5 mM) sowie der jeweiligen α -D-Hydroxysäure inkubiert. Die entstandenen PF-Derivate wurden mit Ethylacetat extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Visualisierung der Produkte erfolgte über Autoradiogramme. Unabhängig davon wurden einzelne unmarkierte PF-Derivate mit HPLC-ESI-MS/MS vermessen.^[ix] Für die Charakterisierung der α -D-Hydroxysäurenbindungsstelle der PF-Synthetase (PFSyn) wurde im ersten Versuchsansatz die Substrattoleranz bezüglich nicht-aromatischer α -D-Hydroxysäuren untersucht. In Abbildung 174 sind die relativen k_{cat} -Werte der synthetischen α -D-Hydroxysäuren hinsichtlich des Einbaus in den Cyclooctadepsipeptidring im direkten Vergleich zu einem natürlichen Substrat, D-Lac (**258**; 100%) wiedergegeben. Die PF-Synthetase weist im Vergleich zu ESyn eine erheblich größere Substrattoleranz bezüglich der nicht-aromatischen Verbindungen auf. Ersatz eines Wasserstoffatoms der Methylgruppe von D-Lactat (**258**) durch Chlor (**272**), Fluor (**271**) oder Brom (**273**) wurden von der PFSyn sehr gut toleriert bzw. führten zu einer signifikanten Aktivitätszunahme, was sich in den prozentualen k_{cat} -Werten der Verbindungen widerspiegelt (174%, 166%, 121%). Für das Alkin-Derivat (**269**; 156%) bestätigten sich die für die ESyn gemachten Beobachtungen bezüglich der deutlich größeren Aktivität im Vergleich zu dessen korrespondierenden gesättigtem Derivat (**260**; 110%). In Abbildung 175 ist anhand des Alkin-Derivats (**269**) exemplarisch die *in vitro*-Synthese mittels der PFSyn und anschließender Analytik wiedergegeben. Im Gegensatz zu der ESyn führte eine Kettenverlängerungen der aliphatischen α -D-Hydroxysäuren über Ethyl (**259**), *n*-Propyl (**260**) bis hin zu *n*-Butyl (**261**) zu keiner nennenswerten Beeinträchtigung der PFSyn-Aktivität (93%,

^[ix] für Details siehe experimenteller Teil dieser Arbeit.

110% und 100%). Selbst die Substitution einer terminalen CH₂-Gruppe von **261** (100%) durch Schwefel (**275**; 112%) wurden von der Synthetase ohne Aktivitätsverlust toleriert. Jedoch führte eine Verzweigung in der 2-Position der aliphatischen α -D-Hydroxysäuren-Derivate, Isopropyl (**266**; 60%), *tert*-Butyl (**267**; 54%), oder in 3-Position Isobutyl (**263**; 59%) und das Neopentyl (**268**; 68%) zu einer starken Reduktion der PFSyn-Aktivität. Verzweigungen in der 2-Position, mit entgegengesetzter Konfiguration wie anhand der Verbindung **265** (51%) mit einer (*R,R*)-Konfiguration der *sec*-Butyl-Seitenkette zu sehen ist, hatten eine starken Aktivitätsabfall zu Folge, wohingegen das korrespondierende Derivat **264** (0%) mit einer (*R,S*)-Konfiguration ausgehend von *allo*-Isoleucin nicht von der PFSyn akzeptiert wurde. Polare Substituenten in 3-Position von **279** führen zu einer signifikanten Abnahme der PFSyn-Aktivität (73%).

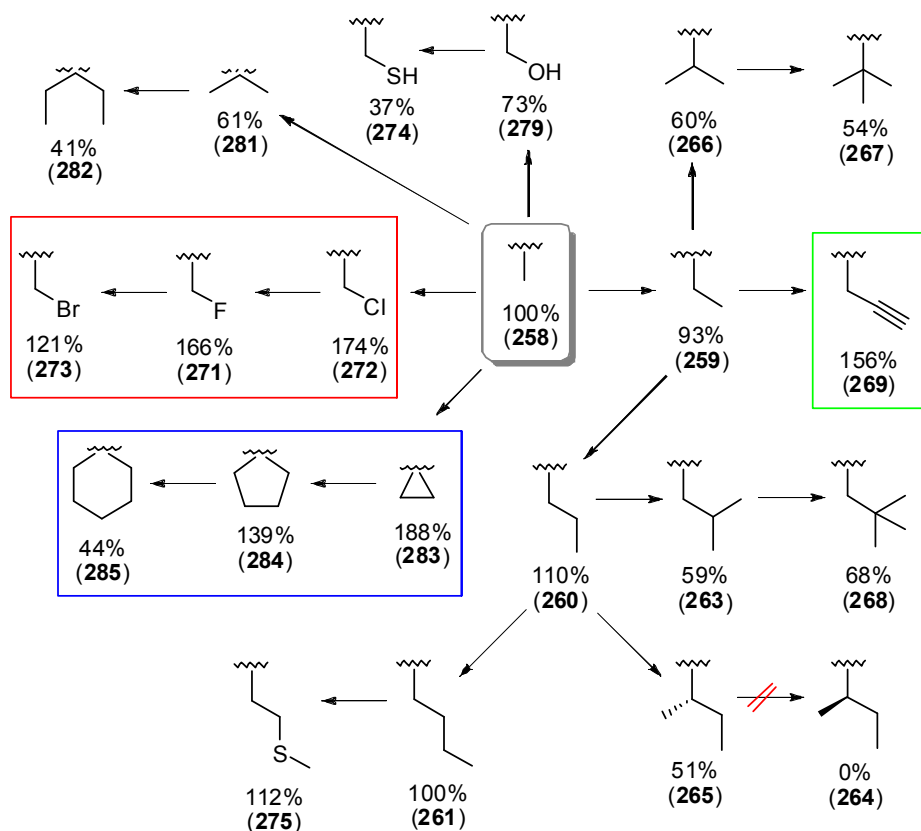


Abbildung 174: Schematische Darstellung der prozentualen k_{cat} -Werte der synthetischen α -D-Hydroxysäuren bezüglich ihrer Einbauraten in den Cyclooctadepsipeptidring mittels der PF-Synthetase (PFSyn), im direkten Vergleich mit dem natürlichen Substrat D-Lac (**258**); $3.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} = 100 \%$.^[274]

Die *in vitro*-Ergebnisse der α,α -disubstituierten Hydroxysäuren (**281-285**) sollen in diesem Abschnitt nur beiläufig erwähnt werden, da wie auch schon im Fall der *in vitro*-Synthese mittels der Enniatin-Synthetase eine Produktbildung zwar mittels DC und Autoradiogramm

nachweisbar war, aber die entsprechenden Molekülmassen- bzw. Fragmentierungsmuster nicht detektiert werden konnten. Die prozentualen k_{cat} -Werte der α,α -D-Hydroxysäuren ergaben interessante PFSyn-Aktivitäten, wobei es in Folge des α,α -quartär substituierten Cyclopropyl-Derivat (**283**; 188%) fast zu einer Verdopplung der PFSyn-Aktivität kam, wohingegen eine Aufweitung der cyclischen Struktur über Cyclopentyl (**284**; 154%) bis hin zu Cyclohexyl (**285**; 44%) eine sukzessive Abnahme der Aktivität zu Folge hatte. Die analogen nicht-zyklischen α,α -Hydroxysäuren **281** (61%) und **282** (41%) wurden deutlich schlechter von der PF-Synthetase umgesetzt als die entsprechenden zyklischen Derivate (**283**, **284**). Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in der freien Drehbarkeit der Methyl- (**281**) bzw. Ethyl-Gruppen (**282**) der aliphatischen α,α -Hydroxysäuren im direkten Vergleich zu den eher starren zyklischen Strukturen (**284**, **285**) begründet. Eine andere Möglichkeit wäre wie die bereits für die Enniatin-Synthetase angenommene Bildung von Diketomorpholinen (**628**) oder Tetradepsipeptiden (**629**), s. Abbildung 176.

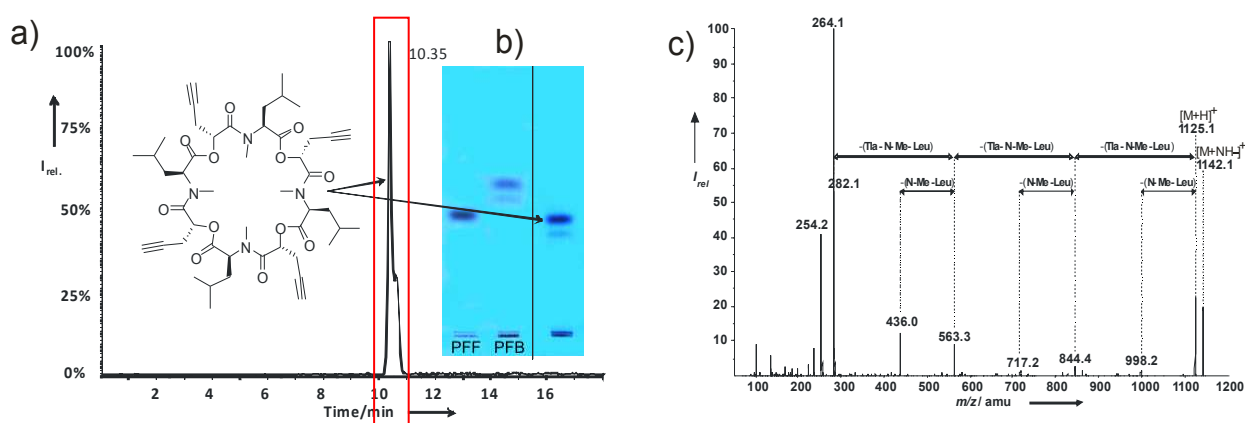


Abbildung 175: *In vitro*-Synthese von „Propargyl-D-lactyl-PF1022 mittels der PF-Synthetase (PFSyn); a) Extracted ion Chromatogramm des HPLC-ESI-MS Laufs und die Strukturformel von „Propargyl-D-lactyl-PF1022; b) Autoradiogramm der DC-Trennung von natürlichen PF1022F (**235**, PFF) und PF1022B (**230**, PFB), sowie dem chemoenzymatischen „Propargyl-D-lactyl-PF1022; c) MS/MS Spektrum von „Propargyl-D-lactyl-PF1022: berechnet: 893.48 $[M+H]^+$; gefunden: 893.50 $[M+H]^+$.^[274]

Die Umsetzung der α,α -substituierten Hydroxysäuren durch die PF-Synthetase zu den entsprechenden Dipeptidol-Einheiten könnten aufgrund einer vorzeitigen Abspaltung während der Biosynthese, entweder als Di- oder Tetrapeptide vorliegen welche ihrerseits die jeweiligen Diketomorpholine oder Tetradepsipeptide bilden (Abbildung 176). Die Hypothese konnte bisher nicht per HPLC-ESI-MS-Analytik nachgewiesen werden, und beruht im Augenblick ausschließlich auf den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie und der Autoradiogramme. Daher bedarf es einer weiterführenden Untersuchung der α,α -quartär

substituierten Hydroxysäuren und der möglichen Produkte insbesondere deren Bestätigung mit NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Im zweiten Versuchsansatz sollte die Substrattoleranz der PF-Synthetase hinsichtlich der aromatischen und heterozyklischen α -D-Hydroxysäuren-Derivate untersucht werden. Zusätzlich zu den genannten Verbindungen wurden noch die Cyclohexyl-Derivate (**288**, **289**) in den *in vitro*-Assay mit aufgenommen, um den Einfluss der unterschiedlichen Konformationen der Sechsring-Derivate bezüglich der PFSyn-Aktivität bzw. Substrattoleranz zu untersuchen. In Abbildung 177 sind die relativen k_{cat} -Werte bezüglich der Einbaurate in den Cyclooctadepsipeptidring der synthetischen aromatischen, heterozyklischen und zyklischen α -D-Hydroxysäuren, im Vergleich zu dem natürlichen Substrat, D-PheLac (**291**; 100%) wiedergegeben. Wie anhand der k_{cat} -Werte zusehen ist toleriert die PF-Synthetase ein sehr breites Spektrum unterschiedlichster Phenyllactat-Derivate, wie das 4-Iod- (**299**; 122%), 4-Brom- (**298**; 101%), 4-Fluor- (**296**; 85%) und 4-Chlor-Derivat (**297**; 82%). Spannenderweise war das Penta-Fluor-PheLac-Derivat (**300**) die aktivste Phenyllactat-Verbindung mit einem prozentualen k_{cat} -Wert von 209%. Weitere Substitutionen in der *para*-Position, wie im Fall der Nitrogruppe von **301** (120%) hatten eine leichte Erhöhung der Aktivität zufolge, wohingegen die Cyanogruppe von **302** (65%) zu einem Aktivitätsabfall führte. Eine Kettenverlängerung (**292**) oder –Verkürzung um eine Methylen-Gruppe (**290**), führte zu einer leichten Abnahme der PFSyn-Aktivität (87% und 74%).

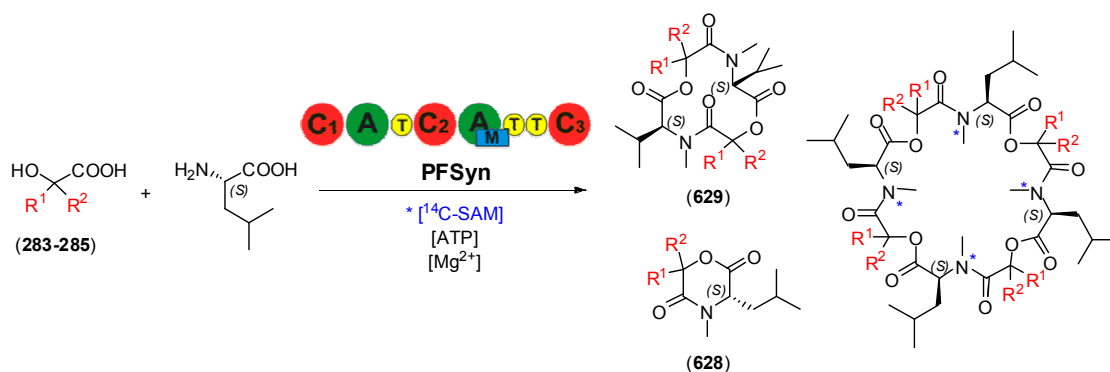


Abbildung 176: Bildung von Diketomorpholinen (**628**) und Tetradepsipeptiden (**629**) im Zuge der *in vitro*-Synthese (ESyn) mit den α, α -quartär substituierten Hydroxysäuren (**283-285**).

Die Einführung sterisch anspruchsvoller Biphenyl- (**294**; 47%), Naphtyl- (**295**; 42%) und Diphenyl-Derivaten (**293**; 49%) war aufgrund der weitgefächerten Substrattoleranz der PF-Synthetase möglich, was aber einen signifikanten Aktivitätsabfall zur Folge hatte. Bemerkenswerterweise, führte der Ersatz des Benzylsystems von D-PheLac (**291**) durch ein Thienyl-System (**305**; 120%) zu einer deutlichen Aktivitätserhöhung. In Abbildung 178 ist anhand des Thienyl-Derivats (**305**) die *in vitro*-Synthese und anschließende Analytik

aromatischer PF-Derivate exemplarisch wiedergegeben. Im Gegensatz dazu setzt der Einbau des heterozyklischen Imidazol-Derivats (**307**; 42%) die PFSyn-Aktivität drastisch herab, was möglicherweise auf den basischen Charakter des Imidazols zurückgeführt werden kann. Die zuletzt getesteten Cyclohexyl-Derivate hatten eine reduzierte PFSyn-Aktivität zur Folge, wobei das in 2-Position substituierte Cyclohexyl-Derivat (**289**; 88%) die Aktivität nur mäßig verringerte, eine Substitution in 3-Position (**288**; 67%) jedoch zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität führte. Die relativen k_{cat} -Werte in Abbildung 174 und 177 suggerieren, dass die α -D-Hydroxysäurenbindungstelle im MA-Modul der PFSyn eine enorme Substrattoleranz hinsichtlich beider, sowohl aliphatischer als auch aromatischer α -D-Hydroxysäuren aufweist.

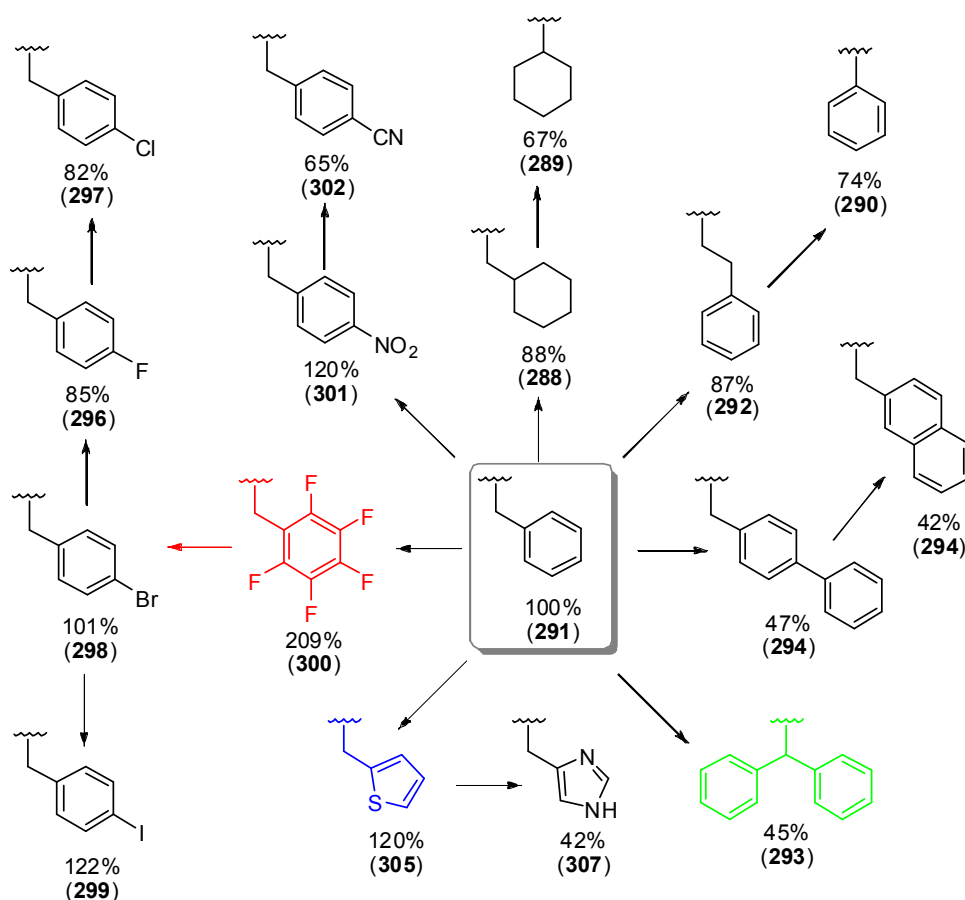


Abbildung 177: Schematische Darstellung der prozentualen k_{cat} -Werte (natürliches Substrat D-PheLac (1) $4.1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} = 100 \%$) bezüglich der Einbauraten aromatischer bzw. heterozyklischer und zyklischer α -D-Hydroxysäuren in den PF-Ring. Das Penta-Fluor-PheLac-Derivat (**300**) ist in rot, das Thienyl- **305** in blau und Diphenyl-Derivat **293** in grün dargestellt.^[274]

Der direkte Vergleich mit den Ergebnissen der Enniatin-Synthetase zeigt deutlich, dass die PFSyn ein bemerkenswert breites Spektrum unterschiedlichster α -D-Hydroxysäuren umsetzen kann, wohingegen die ESyn Substratrestrictionen unterworfen ist. Eine genauere

Betrachtung der Ergebnisse bzw. prozentualen k_{cat} -Werte liefert folgendes Bild der Hydroxysäurenbindungstelle des MA-Moduls der PF-Synthetase: Hinsichtlich Substitutionen in der 2-Position kommt es kaum zu einer Substratlimitierung, wenn gleich aliphatische Reste (**259-261**) gegenüber den verzweigten aliphatischen Resten von **266** und **267** deutlich bevorzugt werden. Interessanterweise war das (*R*)-Enantiomer der *sec*-Butyl-Seitenkette von **265** (51%) ein durchschnittliches Substrat, wohingegen das inverse (*S*)-Enantiomer von **264** (0%) inaktiv war. Dieselbe Enantioselektivität konnte auch bei der ESyn beobachtet werden, und deutet auf eine Homologie der beiden Synthetasen in ihrer Hydroxysäurenbindungstelle hin. Die halogenierten Lactat-Derivate, 3-Chlor- (**272**; 174%), 3-Fluor- (**217**; 166%) und 3-Brom-lactat (**273**; 121%) weisen alle eine deutliche Erhöhung der PFSyn-Aktivität auf. Eine Zunahme des sterischen Anspruchs in der 3-Position durch verzweigte Methylgruppen von **263** und **268** führt zu einem deutlichen Aktivitätsabfall. Der Ersatz einer terminalen Methylengruppe (**261**) durch Schwefel (**275**) beeinträchtigt die Enzymaktivität in keinsten Weise, es kam indessen zu einer leichten Aktivitätserhöhung. Hervorzuheben unter den nicht-aromatischen Verbindungen ist das Alkin-Derivat (**269**) welches die größte Aktivität (156%) innerhalb der getesteten aliphatischen α -D-Hydroxysäuren aufweist, und ein ausgezeichnetes Substrat für postbiosynthetische Modifikation darstellt. Unter den aromatischen α -D-Hydroxysäure-Derivaten wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Substituenten in *para*-Position akzeptiert. Die halogenierten Phenyllactat-Derivate wie das, 4-Iod- (**299**; 122%), 4-Brom- (**298**; 101%), 4-Fluor- (**296**; 85%) und 4-Chlor-Derivat (**297**; 82%) wurden sehr gut von der Synthetase akzeptiert.

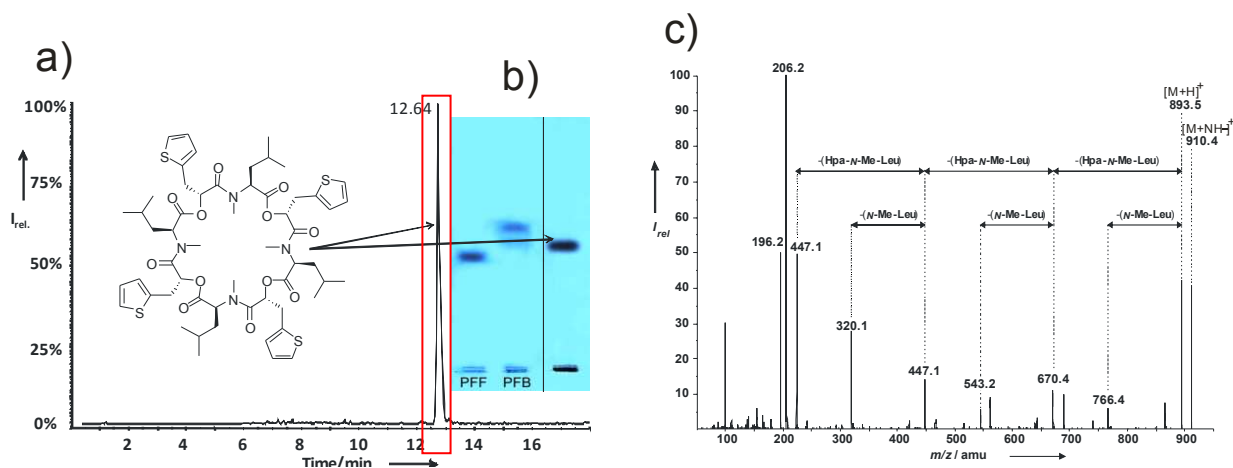


Abbildung 178: *In vitro*-Synthese von „Thienyl-D-lactyl-PF1022 mittels der PF-Synthetase (PFSyn); a) Extracted ion Chromatogramm des HPLC-ESI-MS Laufs und die Strukturformel von „Thienyl-D-lactyl-PF1022; b) Autoradiogramm der DC-Trennung von natürlichen PF1022F (**235**, PFF), PF1022B (**230**, PFB) und chemoenzymatischen „Thienyl-D-lactyl-PF1022; c) MS/MS-Spektrum von „Thienyl-D-lactyl-PF1022: berechnet: 1125.43 $[M+H]^+$; gefunden: 1125.1 $[M+H]^+$.^[274]

Bemerkenswerterweise war das Penta-Fluor-Derivat (**300**) die aktivste Verbindung (209 %) unter den Phenyllactat-Derivaten, obgleich bezüglich eines Induktiven- oder Mesomeren-Effekts derzeit keine Aussagen gemacht werden können. Elektronenziehende Substituenten in *para*-Position wie, 4-Cyanobenzyl (**302**) und 4-Nitrobenzyl (**301**) werden ähnlich gut wie das natürliche Substrat (**291**) akzeptiert. Eine drastische Vergrößerung des sterischen Anspruchs durch mehrkernige aromatische Verbindungen (**293-295**) führten zu einer signifikanten Reduktion der PFSyn-Aktivität, wie auch eine Verlängerung (**292**) oder Verkürzung (**290**) um eine Methylengruppe zwischen den Phenylresten. Bemerkenswerterweise wurden auch die heterozyklischen α -D-Hydroxysäuren-Derivate **305** und **307** von der PFSyn akzeptiert, jedoch unter Vorbehalt, da das Imidazol-Derivat **307** aufgrund seiner basischen Eigenschaften zu einer Reduktion der PFSyn-Aktivität führte. Polare Funktionen in der 3-Position (**279**) scheinen wie auch schon die basischen Eigenschaften einen negativen Einfluss auf die PFSyn-Aktivität zu haben. Der direkte Vergleich der sp^2 -hybridisierten aromatischen Verbindungen (**290**; 100%, **291**; 74%) mit den sp^3 -hybridisierten Cyclohexyl-Derivaten (**288**; 88%, **289**; 67 %) lässt die Vermutung zu, dass die weniger sterisch anspruchsvollen, planaren aromatischen Systeme gegenüber den sp^3 -hybridisierten Derivaten bevorzugt von der PFSyn umgesetzt werden. Dennoch ist die PF-Synthetase in der Lage sowohl aliphatische als auch aromatische α -D-Hydroxysäuren umzusetzen, und es ist daher keine Überraschung, dass mittels der PFSyn durch Inkorporation von α -D-Hydroxyisovaleriansäure auch die sog. Bassianolide gebildet werden. Wobei noch ungeklärt ist, ob auch die Bassianolid-Synthetase in der Lage ist PF-Derivate zu erzeugen. Aufgrund der Charakterisierung des analogen Systems von ESyn konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine *in vitro*-Umsetzung in das entsprechende Beauvericin durch die Enniatin-Synthetase nicht möglich ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die PF-Synthetase eine bisher unbekannte Substrattoleranz hinsichtlich eines enorm breiten Spektrums unterschiedlichster aliphatischer und aromatischer α -D-Hydroxysäuren aufweist. Die gegenwärtigen Ergebnisse deuten auf eine gelockerte Substratspezifität gegenüber elektrostatischen Effekten, sowie großen sterisch anspruchsvollen Derivaten hin. Die Substrattoleranz der PF-Synthetase ist bei weitem stärker ausgeprägt als die der ESyn, und gestattet daher die *in vitro*-synthetische Darstellung umfassender PF-Bibliotheken in ungeahnter Diversität. Die Umsetzung der bisherigen Ergebnisse auf eine mutasynthetische Anwendung muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Die Darstellung ausreichender Substanzmengen der PF-1022-Derivate ist der nächste Schritt für eine umfangreiche Charakterisierung ihrer Bioaktivitäten. Postbiosynthetische Modifikationen der halogenierten (**272**, **273**) sowie ungesättigten PF-Derivate (**269**) mittels S_N -Reaktionen oder Click-Chemie ermöglichen zusätzliche die Derivatisierung der PF-Derivate.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das peptidische Epoxid E-64 (**21**) wurde 1978 von Hanada *et al.* aus *Aspergillus japonicus* TPR-64 isoliert.^[152] Kurz darauf wurde für E-64 (**21**) und seine synthetischen Derivate (**23**, **24**) eine selektive Aktivität gegenüber den papainähnlichen Cysteinproteasen nachgewiesen.^[96,153,154] Aufgrund ihrer geringen Toxizität, sowie der enormen Reaktivität und Selektivität bezüglich den papainähnlichen Cysteinproteasen wurden die E-64-Verbindungen zu Standardwerkzeugen biologischer und biophysikalischer Studien.^[155-158] In den Jahren 1988 wurde zuerst mittels NMR^[159] und anschließend per Röntgenkristallographie^[159-161] der hochkonservierte Bindungsmodus von E-64 (**21**) ermittelt. SAR-Studien der E-64-Derivate offenbarten die notwendigen Anforderungen an eine effektive Bindung zu den papainähnlichen Cysteinproteasen.^[160] Barrett und Mitarbeiter entwickelten ebenfalls eine Reihe von Inhibitoren auf der Basis des Epoxybernsteinsäure-Motivs. Besonders hervorzuheben sind hierbei die CA030 (**32**), CA074 (**33**) und CA028 (**34**) Inhibitoren, welchen eine enorme Selektivität hinsichtlich Cathepsin B aufweisen.^[162-165] Wie sich zeigte, binden sie nach einem alternativen Modus, in dem die Carboxyfunktion ähnlich dem C-Terminus eines natürlichen Substrats an die „occluding loop“ von CatB dockt.^[164] Katunuma *et al.* entwickelten auch eine Serie Epoxybernsteinsäure-basierender, bezüglich Cathepsin L selektiver Inhibitoren. Hervorzuheben sind hauptsächlich CLIK-006 (**25**)^[166,167] und CLIK-148 (**26**),^[168] da beide eine hohe Spezifität gegenüber Cathepsin B, K, S und C demonstrieren. Leider wurden nur unvollständige und unübersichtliche Daten aufgelistet, wobei eine Angabe der kinetischen Daten gänzlich fehlt. Ein Austausch des Epoxy-Motivs führte im Allgemeinen zu einer dramatischen Verschlechterung der Inhibition. Dies führt uns zu einer weiteren Substanzklasse für die irreversible Hemmung von Cysteinproteasen. So können ungesättigte Verbindungen mit einer aktivierten Doppelbindung welche als Michaelsystem fungiert nucleophil angegriffen werden. Ein Beispiel hierfür ist der Inhibitor DC-11 (**22**), ein Analogon von E-64c (**24**), bei dem das Epoxysuccinat durch ein Fumarat ersetzt wurde.^[170] Dass der Mechanismus der Inhibierung über eine Michaeladdition verlaufen muss ging aus Beobachtungen hervor, in welchen der Inhibitor sowohl mit Cysteinen als auch mit Mercaptoethanol reagiert. Es wurden keine Reaktionen mit Serinproteasen oder Esterasen beobachtet.^[13] DC-11 (**22**) war jedoch ein 100-fach schwächerer Inhibitor als die analoge Epoxy-Verbindung E-64c (**24**).^[170] Die absolute Konfiguration der Epoxy-Derivate ist von entscheidender Bedeutung, da dass D-(2*R*,3*R*)-Isomer im Vergleich zu dem natürlichen L-(2*S*,3*S*)-Isomer von E-64 (**21**) ein deutlich vermindertes inhibitorisches Potential aufweist.^[170] Studien mit weiteren E-64-Derivaten zeigten zunächst ebenfalls eine klare Bevorzugung der (2*S*,3*S*)-Konfiguration.^[96,175,176] Schaschke und Mitarbeiter widerlegten jedoch die strikte Bevorzugung der (2*S*,3*S*)-Konfiguration zumindest für die Cathepsin B selektiven Inhibitoren,

welche mit den „ungestrichenen“-Bindungstaschen von CatB wechselwirken.^[67] Leider zeigten die E-64-Derivate keinerlei Selektivität innerhalb der papainähnlichen Cysteinproteasen.^[96,182-185] Schaschke *et al.* adressierte sowohl die „ungestrichene“- als auch „gestrichene“-Seite von Cathepsin B. Ein erstes doppelköpfiges Epoxid (**36**) mit Agmatin-Ornithin-Rest im „ungestrichenen“ Teil der Protease wies entgegen den auf computerbasierten Modellen^[164] gestützten Erwartungen keine verbesserte Bindung des Inhibitors auf. Augenscheinlich sind einzelne Beiträge der Aminosäuren oder Peptidsequenzen nicht einfach additiv; vielmehr wird oftmals eine Bindungsgeometrie erzwungen, welche die Bindung eines anderen Strukturelements stört und so die Gesamtaffinität deutlich gegenüber dem zunächst erwarteten Wert verringert. Bogyo und Mitarbeiter wurden hierdurch inspiriert, eine Bibliothek radioaktivmarkierter bzw. biotinylierter Reportermoleküle herzustellen. Die Epoxy-Peptide DCG-03 (**40**) und DCG-04 (**41**) wurden als Sonde für Studien der zellulären Aufgaben der Cathepsine verwendet. Es wurde demonstriert, dass sich verschiedenen Tumorzelllinien nicht nur im Expressionsmuster sondern auch der Aktivität der einzelnen Cathepsine stark voneinander unterscheiden.^[191,192] Mit einer Bibliothek von DCG-04-Derivaten, in denen die P2-Position variiert wurden, konnten Gewebsextrakte gesunder und entarteter Proben behandelt und die verbleibende Proteaseaktivität mit markiertem DCG-04 visualisiert werden.^[198,199] Die Bevorzugung aliphatischer Aminosäuren in P2-Position konnte infolge dieser Studien bestätigt werden. Andere Aminosäuren führten zu einer verschlechterten Aktivität, jedoch erhöhten sie teilweise die Selektivität leicht. Ein ähnlicher Ansatz mit einer teilrandomisierten Bibliothek vom Typ E6 (**42**) wurde für die Untersuchung der „ungestrichenen“-Seite der Cathepsine verwendet.^[196,197] Ein generelles Defizit von E-64 als CA074 und deren analogen Verbindungen ist das fehlen eines Substitutionsmusters bzw. Seitenkette zur Adressierung der S1-Tasche papainähnlicher Cysteinproteasen. Eine solche S1-Inhibitor-Bibliothek könnten zur gezielten Untersuchung der S1-Taschen papainähnlicher Cysteinproteasen verwendet werden.

Bei den attraktiven Wirksubstanzen, die von Bakterien, Hefen und oder Pilzen produziert werden handelt es sich vorwiegend um Produkte des Sekundärmetabolismus. Cyclodepsipeptide gehören zu einer wichtigen und interessanten Gruppe von Naturstoffen. Die Bioaktivitäten reichen von antitumor, anthelmintisch, fungizid, immunsupprimierend, antimalaria bishin zu entzündungshemmend.^[390] Daher sind sie von großem Interesse für die Entwicklung pharmazeutischer Substanzen. Wichtige Repräsentanten sind die Hexa-, und Octa-Depsipeptide Enniatin^[391] (**220-227**) und PF 1022^[312] (**229-233**). Zahlreiche Enniatin-Derivate wurden aus einer Vielzahl an Pilzen isoliert, z.B. *Fusarium*, *Beauveria*, *Alternaria*, *Verticillium* und *Paecilomyces*.^[391] Die Cyclooctadepsipeptide mit der Bezeichnung PF 1022 wurden im Jahre 1990 aus einem bis dato unbekannten filamentösen Pilz isoliert. Dieser Pilz

stammt aus der Klasse der Ascomyceten.^[313] Es besteht eine sehr nahe Verwandtschaft zu den Hexadepsipeptiden Beauvericin und Enniatin. Die Naturstoffe der PF 1022-Reihe besitzen im Gegensatz zu den Enniatinen keine antimikrobiellen Eigenschaften, sondern fallen aufgrund ihrer bemerkenswerten anthelmintischen Aktivitäten gegen unterschiedliche Nematoden auf.^[314] Beide Verbindungen besitzen herausragende pharmakologische Aktivitäten was sie für die Medicinal-Chemie zu interessanten Verbindungen für die Entwicklung neuer Medikamente macht. Zahlreiche synthetische und biosynthetische Arbeiten auf dem Gebiet dieser Substanzklassen wurden bereits veröffentlicht.

Während auf dem Gebiet der Cysteinprotease-Inhibitoren bereits zahlreiche synthetische Arbeiten beziehungsweise Modellstudien zu den Leitstrukturen E-64 (**21**) und CA074 (**33**) publiziert wurden, gelang im Rahmen dieser Arbeit die erste Synthese trisubstituierter Epoxy-Alken- und Diol-„Warheads“, sowie deren Kondensation mit *E64c*- und *CA028-like*-Dipeptidfragmenten zur Darstellung einer *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptidbibliothek zur Untersuchung der S1-Bindungstaschen papainähnlicher Cysteinproteasen. Hierzu war mehrfach eine grundlegende Optimierung der Synthesestrategie notwendig. Die besondere Herausforderung lag vor allem in der Darstellung der trisubstituierten Epoxy-, Alken-, und Diol-Bausteine, der Etablierung einer einheitlichen Synthesestrategie sowie die racemisierungsfreie Kupplung der Einzelbausteine („Warheads“). Die dargestellte *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptidinhibitoren und zahlreiche synthetische Intermediate konnten in antibakteriellen SAR-Studien sowie enzymkinetischen Studien untersucht werden, und lieferten so erste Erkenntnisse über die antibakteriellen als auch inhibitorischen Aktivitäten.

Während zur *in vitro*-Synthese von Enniatin- und PF 1022-Derivaten bereits unterschiedliche Ansätze publiziert wurden, sollte in dieser Arbeit eine umfangreiche α -D-Hydroxysäurenbibliothek zur gezielten Untersuchung der Hydroxysäurenbindungsstellen der Enniatin- (ESyn) und PF-Synthetase (PFSyn), als auch der chemoenzymatischen Synthese neuer Hexa-, und Octadepsipeptide erfolgen. Ein vergleichsweise schneller Zugang zu einem breiten Spektrum unterschiedlicher α -D-Hydroxysäure-Derivaten für den *in vitro*-Assay war das Ziel. Die Schwierigkeit lag besonders in der Etablierung eines geeigneten Syntheseprotokolls für die Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen.

Die Einzelbausteine („Warheads“) konnten, durch eine geeignete Platzierung retrosynthetischer Schnitte in Hydroxy-, Keto-, Alken-, Diol-, und Epoxy-Bausteine zerlegt werden. Die enantioselektive Darstellung der α -L-Hydroxysäuren gestaltet sich in Anlehnung an die synthetischen Arbeiten von Bauer *et al.*^[211] ohne erwähnenswerte Schwierigkeiten. Bei der anschließenden Oxidation in die entsprechenden Ketosäuren zeigte sich jedoch, dass aufgrund der unterschiedlichen Seitenketten ein einheitliches Oxidationsprotokoll nur bedingt

realisiert werden konnte, und daher auf mehrere Oxidationsvarianten zurückgegriffen wurde. Prinzipiell war die Oxidation mittels PCC/Periodsäure auf den Großteil der synthetisierten α -L-Hydroxysäuren anwendbar. Bei der Umsetzung zu den entsprechenden Ketosäureestern waren drei unterschiedliche Veresterungsprotokolle notwendig. Dies resultierte aus der Tatsache, dass einige der Ketosäureseitenkettenschutzgruppen unter sauren Bedingungen zu Umesterungsreaktionen neigten. Diesem Umstand konnte in Form relativ milder Veresterungsreaktionen mit Trimethylsilyldiazomethan oder Moc_2O beigegeben werden. Für die anschließenden Umsetzungen der α -Ketosäureester in die entsprechenden Alkene war es möglich diese entweder *E*-selektiv mittels der Wittig-,^[359] oder *Z*-selektiv über die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion^[358,359] darzustellen. Die direkte Epoxidierung der elektronenarmen (*E*)- und (*Z*)-Alkene in die entsprechenden trisubstituierten Epoxide gestaltete sich sehr schwierig. Gängige Epoxidierungsprotokolle mit unterschiedlichsten Persäuren führten zu keinem Erfolg. Erst die Epoxidierung in Anlehnung an die von Moore *et al.*^[246] publizierte Methode zur Epoxidierung elektronenarmer *trans*-Alkene mittels Lithium-*tert*-butylhydroperoxid lieferten die gewünschten trisubstituierten Epoxide. Die Epoxidierung der (*Z*)-Alkene blieb hingegen erfolglos.

Aufgrund des speziellen Reaktionsmechanismus der Epoxidierung (s. Abschnitt 2.4.6) und der Seitenketten der eingesetzten (*E*)-Alkene wurden jedoch immer zwei mögliche Enantiomere (*S,S*) und (*R,R*) gebildet. Mehrfache Versuche zur Trennung der enantiomeren Epoxy-Gemische infolge einer Überführung der Epoxide in diastereomere Ester^[374,375] oder Salze^[367,377] führten leider unter den notwendigen Reaktionsbedingungen zu keinem Erfolg. Ein weiterer Ansatz zur Darstellung enantiomerenreiner Epoxide sollte über die asymmetrische Dihydroxylierung der (*E*)-Alkene mit anschließender stereoselektiver Überführung der entstandenen Dirole in die entsprechenden Epoxide mittels der von Kolb und Sharpless publizierten Methode erfolgen.^[247] Die speziellen Anforderungen während der asymmetrischen Dihydroxylierung ließen jedoch eine Anwendung auf ein breites Spektrum unterschiedlicher (*E*)-Alken-Derivate nicht zu. Daher war es unter diesen Umständen nicht möglich alle Epoxy-Bausteine („Warheads“) enantiomerenrein darzustellen. Die asymmetrische Dihydroxylierung ergab jedoch zusätzlich interessante (*S,S*)- bzw. (*R,R*)-Diol-Derivate für die Darstellung noch bisher unbekannter *E64c*- und *CA028-like*-Diol-Inhibitoren. Die anschließende Kupplung der Einzelbausteine (Alken, Diol, Epoxid) mit den *E64c*- und *CA028-like*-Dipeptiden sollte zuerst festphasengestützt erfolgen. Anhand erster festphasengestützter Synthesestudien wurde jedoch schnell klar, dass sich ein Aufbau an fester Phase für die trisubstituierten Verbindungen nicht eignete. Unter diesem Aspekt wurden die Einzelbausteine („Warheads“) in Anlehnung an die von Sarabia *et al.*^[350] publizierten Methode mit den jeweiligen Dipeptid-Motiven in Lösung gekuppelt. Mittels der

Peptidsynthese in Lösung war es möglich die ersten trisubstituierten Alken-, Diol-, und Epoxy-Tripeptide darzustellen. Neben den noch bisher unbekannten antibakteriellen Aktivitäten der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide, sowie die der zahlreichen synthetischen Intermediate, welche in SAR-Studien gefunden wurden, konnte eine Reihe potentieller Cysteinprotease-Inhibitoren identifiziert werden. Einige der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide weisen eine enorme Reaktivität gegenüber Cathepsin B und Cathepsin L auf. Gleichzeitig ist anhand der enzymkinetischen Charakterisierung ersichtlich, dass die eingeführten Substituenten bzw. Seitenketten der Alken-, Diol- und Epoxy-Peptide einen direkten Einfluss auf die Reaktivität und Selektivität der Verbindungen ausüben. Dies konnte auch während des antibakteriellen Screenings beobachtet werden. Weitere Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass eine absolute Konfiguration der aktiven Verbindungen nur teilweise von Bedeutung ist. Hierauf deuten die inhibitorischen Aktivitäten von enantiomerenreinen und racemischen *E64c*- bzw. *CA028-like*-Epoxy-Peptiden hin. Hervorzuheben ist auch das inhibitorische Potential der *E64c*- und *CA028-like*-Diol-Peptide, welche in dieser Form noch nicht beschrieben wurden. Anhand der Diol-Tripeptide wurde eine deutliche Abhängigkeit der Aktivität von der absoluten Konfiguration beobachtet. Im antibakteriellen Screening wies von allen untersuchten Verbindungen sowohl der synthetischen Intermediate als auch der Tripeptide das Fluor-substituierte *CA028-like*-(*E*)-Alken- β -Fluor-Ala-Peptid (**548**) die stärkste Aktivität auf. **548** ist eine bemerkenswerte Verbindung, und überrascht mit beachtlichen Aktivitäten gegenüber den Gram-positiven Erregern *B. subtilis* und *S. aureus*. Eine irreversible Alkylierung einer für die Erreger essentiellen Cysteinprotease könnte daher maßgeblich für die antibakterielle Wirkung von **548** verantwortlich sein.

Die Synthese der α -D-Hydroxysäuren für die chemoenzymatische Darstellung neuer Cyclodepsipeptide sollte in der Art durchgeführt werden, dass ausgehend von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren möglichst in einem Schritt diese enantioselektiv erhalten wurden. Aufgrund der vorausgehenden Synthese einer Vielzahl von L-Hydroxysäuren lies sich das etablierte Protokoll nahezu unverändert auf die Synthese der α -D-Hydroxysäuren übertragen. Einzig die Darstellung der stark hydrophoben und α,α -quartär-substituierten Aminosäuren gestaltete sich schwierig. Durch Anpassung des Diazotierungsprotokolls konnten auch diese Derivate in ausreichenden Mengen und Reinheit dargestellt werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Zocher konnte aufgrund der umfangreichen α -D-Hydroxysäurenbibliothek sowohl ein tiefer Einblick in die Hydroxysäurenbindungsstellen der Enniatin- und PF-Synthetasen erhalten werden, als auch ein breites Spektrum bisher unbekannter Enniatin und PF-Derivate mittels *in vitro*-Synthese dargestellt werden.

Vielfersprechende Ergebnisse aus den enzymkinetischen Charakterisierungen als auch der antibakteriellen Testierungen der *E64c-like*- und *CA028-like*-Tripeptide, sowie deren synthetische Vorläufer bzw. Intermediate verlangen zukünftig genauere Untersuchungen der Wirkmechanismen einzelner Strukturen und damit einhergehend die Bereitstellung ausreichender Substanzmengen. Desweiteren wäre eine ausgedehnte enzymkinetische Charakterisierung weiterer papainähnlicher Cysteinproteasen als auch Aspartylproteasen, sowie wie eine umfangreiche antibakterielle und antivirale Testierung von großem Interesse, um das mögliche Potential der Dargestellten Tripeptide näher zu beleuchten. Größere Substanzmengen können durch Optimierung der einzelnen Reaktionsschritte innerhalb der vorgestellten Synthese gewonnen werden. Zusätzlich wäre die Etablierung eines geeigneten Syntheseprotokolls für die Darstellung eines breiten Spektrums von enantiomerenreinen Epoxiden wünschenswert, welche aufgrund der absoluten Konfiguration genauere Aussagen hinsichtlich der konformationellen Anforderungen an die entsprechenden Tripeptide zulässt. In diesem Zusammenhang ist auch die Synthese von weiteren *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Tripeptiden mittels Neukombination diverser Dipeptid-Motive mit den entsprechenden Warheads einfach zugänglich, ohne bereits etablierte Syntheseprotokolle stark abändern zu müssen. Eine Erhöhung der Affinität und Selektivität gegenüber unterschiedlichen Cysteinproteasen wäre hierdurch möglich. Interessant wäre zudem die Darstellung einer Tripeptid-Bibliothek mittels der synthetisierten (Z)-Alken-Bausteine in Verbindungen mit einer anschließenden Testierung der Verbindungen gegen Aspartyl-Proteasen wie z.B. HIV-1 Protease. Eine weitere Option stellt die Erweiterung der Warhead-Bibliothek mit völlig neuartigen Substitutionsmustern am C-2 oder C-3 der elektrophilen Bausteine dar. Interessant könnte auch der Einbau der elektrophilen Bausteine in zyklische Peptidmotive sein. Vor allem gilt es jedoch, die aktivsten Vertreter der dargestellten *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide gezielt auf bestimmte Mitglieder der papainähnlichen Cysteinproteasen als auch Targets im bakteriellen Stoffwechsel zu untersuchen. Zusätzlich stehen detaillierte Untersuchung bezüglich der *in vivo*-Aktivitäten als auch möglicher zytotoxischen Wirkungen der untersuchten Tripeptide und synthetischen Intermediate gänzlich aus.

Das chemoenzymatische Konzept zur Darstellung neuer Cyclodepsipeptide als auch die Charakterisierung der Hydroxysäurenbindungsstellen der Enniatin- (ESyn) und PF-Synthetase (PFSyn) konnte aufgrund des umfangreichen Spektrums synthetisierter α -D-Hydroxysäuren realisiert werden. Das etablierte Syntheseprotokoll zur Darstellung der α -D-Hydroxysäuren war auf eine Vielzahl der Verbindungen ohne Modifikation anwendbar. Es konnte gezeigt werden, dass die ESyn^[275] als auch die PFSyn^[274] eine bisher unbekannte Substrattoleranz hinsichtlich eines breiten Spektrums unterschiedlichster α -D-Hydroxysäuren aufweist. Die Substrattoleranz der PF-Synthetase ist jedoch bei weitem stärker ausgeprägt

als die der Enniatin-Synthetase, und gestattet daher eine *in vitro*-synthetische Darstellung einer ungeahnten Diversität. Über den *in vitro*-synthetischen Ansatz konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von synthetischen α -D-Hydroxysäuren als Substrate der ESyn bzw. PFSyn die Vielfalt der möglichen Derivate drastisch erhöht, so dass die etablierten chemo-enzymatischen Systeme zur Herstellung umfangreicher Hexa- und Octa-Cyclodepsipeptid-Libraries verwendet werden kann. Aufgrund der geringen Mengen *in vitro*-synthetischer Enniatin- bzw. PF-Derivate war es leider nicht möglich ausreichende Mengen für die notwendigen Untersuchungen bezüglich ihrer Bioaktivitäten bereit zu stellen. Dazu wäre eine deutlich größere Stabilität der verwendeten Synthetasen erforderlich. Dieses Ziel könnte u.a. durch Mutagenese der Stämme, Verwendung alternativer Stämme oder weitere Optimierung der Anzuchtbedingungen erreicht werden. In diesem Zusammenhang wäre auch die Etablierung eines geeigneten peptidsynthetischen Ansatzes von großem Interesse, für den schnellen Zugang zu einer Vielzahl von Enniatin- und PF-Derivaten. Einen weiteren Ansatz bieten die postbiosynthetischen Modifikationen der eingeführten Seitenketten der α -D-Hydroxysäuren mittels S_N -Reaktionen, Sonogashira-Kupplung^[385-387] und Click-Chemie,^[383,384] infolge dessen sich das Spektrum möglicher Enniatin und PF-Derivate um ein vielfaches erweitern lässt.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Informationen

Reaktionen wurden stets in bei 100 °C vorgetrockneten Glasgefäßen unter Schutzgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) und magnetischer Rührung durchgeführt (falls nicht anders vermerkt).

Chemikalien wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, D), *Merck* (Darmstadt, D), *Acros* (Geel, Belgien), *Bachem* (Bubendorf, CH), Novabiochem/Merck Biosciences AG (Darmstadt, D), *Riedel-de Haen* (Seelze, D), *Calbiochem/Merck* (Darmstadt, D), *ABCR* (Karlsruhe), *Iris Biotech GmbH* (Marktreidwitz, D), *Fluka* (Buchs, CH) und *Alfa Aesar* (Karlsruhe), bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Lösungsmittel wurden von den Firmen *Acros* (Geel, Belgien), *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen), *Fluka* (Buchs, CH) und *Merck* (Darmstadt), bezogen und wasserfrei, wie gekauft, verwendet. Deionisiertes Wasser wurde mittels eines *Super-Q™ Plus* Wasseraufbereitungssystems der Firma *Millipore* (Billerica, USA) gewonnen und verwendet.

Enzyme und Enzymsubstrate wurden von den Firmen *Calbiochem/Merck* (Darmstadt, D), *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, D), *Bachem* (Bubendorf, CH), *Fluka* (Buchs, CH) und *Merck* (Darmstadt, D), bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Dünnschichtchromatogramme (DC) wurden mit kieselgelbeschichteten Aluminiumfolien der Firma *Merck* (Darmstadt) (TLC Kieselgel 60, F₂₅₄) aufgenommen. Verbindungen wurden entweder durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) oder durch das Eintauchen in geeignete Färbereagenzien mit anschließendem Erhitzen sichtbar gemacht. Die Epoxy-Verbindungen wurden durch Besprühen der Dünnschichtplatte mit einer Lösung von 4-(4-Nitrobenzyl)pyridin in Aceton, anschließendem Erhitzen der Dünnschichtplatte auf 100 °C und nochmaligen Besprühen mit 20%iger Tetraethylenpentin-Lösung in Aceton als blaue bis purpurfarbene Spots nachgewiesen.^[392] Die Laufmittelzusammensetzungen werden in Volumenteilen angegeben.

Permanganat-Reagenz: 3 g KMnO₄, 20 g K₂CO₃, 300 ml H₂O, 5 ml 5%ige NaOH

Molybdat-Reagenz: 20 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 400 ml 10%ige H_2SO_4

Ninhydrin-Reagenz: 0.3 g Ninhydrin, 100 ml *n*-BuOH

4-(p-Nitrobenzyl)-Pyridin-Reagenz: 5 g NBP, 300 ml Aceton

Tetraethylenpentamin-Reagenz: 15 g Tetraethylenpentamin, 280 ml Aceton

Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firma *Acros* (Geel, Belgien) (0.04-0.064 μm , 60 Å) durchgeführt. Eluiert wurde unter erhöhtem Druck (Druckluft) mit unterschiedlichen Kombinationen folgender Eluenten (*n*-Hexan, Ethylacetat, Diethylether, Dichlormethan, Chloroform, Methanol). Die Laufmittelzusammensetzungen werden in Volumenteilen angegeben.

Gefriertrocknung erfolgte mit dem Modell *Alpha 2-4* der Firma *Christ* (Osterode, D). Als Lösungsmittel wurde Acetonitril/Wasser (1:10 v/v), oder Methanol/Wasser (2:10) verwendet, die Trocknung erfolgte bei 0.05 mbar und -72 °C.

^1H -NMR-Spektren wurden mit einem AM 400 (400 MHz) der Firma *Bruker* (Karlsruhe, D) aufgenommen. Die Arbeitsfrequenz lag bei 400.13 MHz und die Messtemperatur lag bei 298 K. Als interner Standard diente bei ^1H -NMR-Spektren die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels Deuteriochloroform (CDCl_3) = 7.25 ppm, Deuteromethanol (CD_3OD) = 3.30 ppm und DMSO- d_6 = 2.49 ppm. Die chemischen Verschiebungen sind in σ -Werten (ppm) relativ zum Restsignal der undeuterierten Lösungsmittelanteile angegeben. Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben. Signalmultiplizitäten sind wie folgt gekennzeichnet: (s) Singulett, (d) Dublett, (dd) Dublett von Dublett, (t) Triplett, (dt) Dublett von Triplett, (q) Quartett, (pent) Pentett, (m) Multiplett und (br) breit. Die Spektren wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 298 K aufgenommen (Auswertungssoftware: ACDLabs, Topspin, XWinNMR).

^{13}C -NMR-Spektren wurden mit einem AM 400 (400 MHz) der Firma *Bruker* (Karlsruhe, D) aufgenommen. Die Arbeitsfrequenz lag bei 100.61 MHz und die Messtemperatur lag bei 298 K. Als interner Standard diente bei ^{13}C -NMR-Spektren die ^{13}C -Resonanzsignale des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels Deuteriochloroform (CDCl_3) = 77.0 ppm, Deuteromethanol (CD_3OD) = 49.0 ppm oder DMSO- d_6 = 39.5 ppm. Die chemischen Verschiebungen sind in σ -Werten (ppm) angegeben (Auswertungssoftware: ACDLabs, Topspin, XWinNMR).

IR-Spektren wurden mit dem FTIR-Spektrometer Nicolet Magna 750 der Firma *Thermo Scientific* (Waltham, Massachusetts, USA) als ATR (*attenuated total reflectance*) aufgenommen. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen [cm^{-1}] angegeben (Auswertungssoftware: OMNIC).

MS-Spektren (auch Hochauflösung) wurden auf einem Finnigan MAT 95 SQ der Firma *Thermo Scientific* (Waltham, Massachusetts) oder Varian MAT 771 der Firma *Varian* (Palo Alto, Kalifornien) aufgenommen. Die Ionisierung der Substanzen erfolgte durch Elektronenstoß (EI, *electron impact*) mit einem Ionisierungspotential von 70 eV, durch FAB (*fast atom bombardement*) oder CI (*chemical ionisation*). HPLC-MS-Kopplungen wurden mit dem ESI-Massenspektrometer (*electrospray ionisation*) QTrap 2000 der Firma *Applied Biosystems* (Darmstadt, D) in Kopplung mit einem Agilent 1100 HPLC-System der Firma *Agilent Technologies* (Waldbronn, D) unter Verwendung einer RP-C₁₈-Säule der Firma *Phenomenex* (Aschaffenburg, D) vorgenommen (Lösungsmittel A: Wasser / 0.1 % HCOOH; Lösungsmittel B: Acetonitril / 0.1 % HCOOH; Flussrate: 1.5 ml/min; Auswertungssoftware: Analyst).

Chirale HPLC-Analytik wurde an einem Merck-Hitachi LaChrom System der Firma *Hitachi* (Tokyo, Japan) unter Verwendung einer CHIRALPAK AD-H Säule der Firma *Chiral Technologies Europe* (Illkirch, Frankreich) mittels UV-Detektion ($\lambda = 254 \text{ nm}$) durchgeführt. Als Lösungsmittelsystem diente eine Kombination aus *iso*-PrOH und *n*-Hexan bei einer Flussrate von 0.8 ml/min. Die *ee*-Werte [%] wurden über die Verhältnisse der Peakintegrale (*VWR HPLC System Manager*) nach folgender Formel^[363] errechnet:

$$ee[\%] = \frac{(E_+ - E_-)}{(E_+ + E_-)} \times 100$$

Wobei E_+ die Integralfläche des im Überschuss gebildeten Enantiomers, und E_- die Integralfläche des im Unterschuss gebildeten Enantiomers entspricht.

Präparative RP-HPLC Trennungen wurden auf einer Agilent HP 1100 HPLC-Anlage mit UV-Detektor ($\lambda = 280 \text{ nm}$) der Firma *Agilent Technologies* (Waldbronn, D) unter Verwendung der RP-C₁₈-Säule Grom-Sil 300 ODS-5 ST der Firma *Grom* (Rottenburg-Hailfingen, D) durchgeführt. Als Lösungsmittelsysteme wurden entweder Wasser / 0.1 % HCOOH (Lösungsmittel A) und Acetonitril / 0.1 % HCOOH (Lösungsmittel B) oder Wasser (Lösungsmittel C) und Acetonitril (Lösungsmittel D) bei einer Flussrate von 15 ml/min verwendet. Die jeweiligen Gradienten sind an entsprechender Stelle angegeben (Auswertungssoftware: Agilent ChemStation).

Drehwerte $[\alpha]_D$ wurden an einem Polarimeter 341 der Firma *Perkin-Elmer* (Waltham, Massachusetts) unter Verwendung einer Küvette mit 10 cm Strahlengang bei einer Temperatur von ca. 25 °C ermittelt (Natriumdampflampe: $\lambda = 589$ nm). Detektiert wurde die optische Rotation α mit der Einheit [°]. Angegeben sind zudem die jeweiligen Konzentrationen [g/100 ml]. In der Literatur werden Drehwerte immer um die Länge der Küvette und die Konzentration der Probe bereinigt angegeben. Die Drehwerte wurden nach folgender Formel berechnet:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{(\alpha \cdot 100)}{c}$$

Photometrie-UV/Vis-Spektroskopie wurden an einem Zweistrahl-Photometer *Lambda 20* der Firma *Perkin-Elmer* (Waltham, Massachusetts, USA) mit thermostatierbarem Küvettenhalter aufgenommen und mit der Software *FI WinLab* (Version 3.00) der Firma *Perkin-Elmer* (Waltham, Massachusetts, USA) ausgewertet. Die Enzymkonzentrationen wurden so gewählt, dass die gemessenen Absorptionen zwischen 0.1 und 1.0 Absorptionseinheiten lagen. Zur Aufnahme der Spektren wurden *Quarz Suparsil*® Küvetten 105.251-QS der Firma Hellma (Mühlheim, D) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet.

Enzymkinetische Daten wie V_{\max} , K_M , k_{cat} und Inhibitionskonstanten (K_i , k_i , $k_{2\text{nd}}$, IC_{50}) wurden unter Verwendung des Programms *KinLab* der Firma *Perkin-Elmer* (Waltham, USA) und *GraFit 6.0* der Firma *Erithacus Software Limited* (Surrey, UK) erstellt.

Chemische Namen wurden unter zu Hilfenahme des Programms ChemDraw Ultra 10.0. der Firma *CambridgeSoft Corporation* (Cambridge, Massachusetts) erstellt. Zum besseren Verständnis wurde vielfach von dieser Nomenklatur abgewichen und eine logische Kurznomenklatur eingeführt.

6.2 Experimentelle Details zur Durchführung enzymkinetischer Testierungen

Alle enzymkinetischen Messungen erfolgten mit einem *Lambda 20* Photometer der Firma *Perkin-Elmer* mit thermostatierbaren Küvettenhalter. Die Versuchsdurchführung wurden in *Quarz Suparsil*® Küvetten (Ø 10mm) der Firma Hellma durchgeführt. In den Tabellen sind alle Assay-Konzentrationen als Endkonzentrationen angegeben.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet: E = Enzym; S = Substrat; P = Puffer; I = Inhibitor.

Tabelle 6.2.1: Verwendete Enzyme, Enzym-Substrate und Referenz-Inhibitoren.

Enzyme:	Hersteller:
Papain von <i>Papaya latex</i>	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Papain von <i>Papaya carica</i>	Sigma-Aldrich-Fluka (Buchs, CH)
Papain von <i>Papaya carica</i>	Calbiochem/Merck (Darmstadt, D)
Cathepsin B (<i>Bovine Spleen</i>)	Calbiochem/Merck (Darmstadt, D)
Cathepsin L (<i>Human Liver</i>)	Calbiochem/Merck (Darmstadt, D)
Substrate:	Hersteller:
Pyr-Phe-Leu-pNA (für Papain)	Bachem (Bubendorf, CH)
Z-Arg-Arg-pNA (für CatB)	Bachem (Bubendorf, CH)
Z-Phe-Arg-pNA (für CatL)	Bachem (Bubendorf, CH)
Referenz-Inhibitoren:	Hersteller:
E-64	Bachem (Bubendorf, CH)
E-64d	Bachem (Bubendorf, CH)
CA074	Calbiochem/Merck (Darmstadt, D)

Für die Ermittlung der günstigsten Assaybedingungen der Enzyme *Papain Carica Papaya*, *Papain Latex*, *Cathepsin B* und *Cathepsin L* wurden bei gleicher Enzymkonzentration je drei Messungen bei 12 unterschiedlichen Substratkonzentrationen, *Papain carica* (1 bis 20 mM), *Papain latex* (1 bis 15 mM), *Cathepsin B* (1 bis 20 mM) und *Cathepsin L* (0.5 bis 12 mM) durchgeführt und daraus die Mittelwerte der initialen Umsatzgeschwindigkeiten über die ersten 10 min ermittelt.^[52,96,379] Jedes Enzym wurde für den photometrischen Assay ($\lambda = 410$ nm, Bandbreite = 2 nm, Messintervall = 3 s) mit dem jeweils verwendeten Puffer so verdünnt, dass die Umsatz-Zeit-Kurve des Enzyms mit dem Substrat über die Messzeit eine maximale lineare Zunahme der Absorption ($\Delta A / \text{min} = 0.05 - 0.1$) erhalten wurde. Desweiteren wurde für jeden neuentwickelten Assay die Michaelis-Konstante (K_m), als auch V_{\max} und k_{cat} durch nichtlineare Regression mit dem Enzymkinetikprogramm Grafit® bestimmt. Für den direkten Vergleich wurde mit den kommerziell erhältlichen Inhibitoren CA074, E64 und E64d für jedes Enzym die IC_{50} -Werte und Inhibitionskonstanten bestimmt. Zur Kontrolle wurde jeweils zu Beginn und Ende der Messungen ein Testansatz vermessen, um zu überprüfen, ob die Enzymaktivität am Ende der Messreihe noch erhalten war. Es wurde maximal ein Aktivitätsunterschied von 10% toleriert. Bei den Ermittlungen der besten Assaybedingungen waren Substrat und Inhibitoren immer in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylformamid (DMF) gelöst und die maximale DMSO-, oder DMF-Konzentration betrug pro Ansatz 10%. Um einer Denaturierung und somit einem Aktivitätsverlust des Enzyms vorzubeugen wurden die DMSO-, oder DMF-Lösungen immer zuletzt zugegeben. Um eine Denaturierung der Enzyme durch eventuell vorhandene Schwermetalle zu verhindern, enthalten die Puffer EDTA. Daneben dient ein niedermolekulares Thiol (DTT = Dithiothreitol) dazu, eine falsche

Disulfid-Brücken im aktiven Zentrum zu reduzieren und damit die Cysteinproteasen zu aktivieren (wird immer frisch zugesetzt). Das nichtionische Tensid Brij 35[®] wurde zur Verbesserung der Löslichkeit von Inhibitor und Substrat zugesetzt und war nur im Assay-, nicht jedoch im Enzym-Puffer enthalten. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 150 µL enthält Enzym, Puffer, Inhibitoren und Substrat. Die exakten Volumina der verwendeten Komponenten und die Reihenfolge ihres Zusammenfügens sind in den Tabellen 6.2.1.1 – 6.2.3.4 wiedergegeben. Aus einer Vielzahl von Messungen wurden schließlich die nachfolgend aufgeführten besten Assaybedingungen ermittelt.

6.2.1 Kontinuierlicher Assay des Tripeptid-Screenings

Tabelle 6.2.1.1: Assaybedingungen des Screenings gegen *Papain carica*.

<i>Papain carica</i> – Kontinuierlicher Assay			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	115 µL
Enzym	<i>Papain carica</i> (3.11 U/mg)	1.0 µM	15 µL
Substrat	Pyr-Phe-Leu-pNA, K _m (PC): 0.38 mM	0.6 mM	15 µL
Temperatur	30 °C		
Detektion	λ = 410 nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Inhibitoren	E64c- bzw. CA028-like- Alken-, -Diol, -Epoxy-Tripeptide	30 µM	5 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

Zur Ermittlung der Aktivität der E64c- bzw. CA028-like-Tripeptide (Inhibitoren) gegen *Papain carica* wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) lag bei 0.6 mM, die des Enzyms bei 1.0 µM und die der Inhibitoren bei 30 µM. Der Assay wurde in 115 µL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (15 µL) im Aktivatorpuffer (115 µL) für 5 min bei 30 °C. Zusätzlich wurde separat auch die Inhibitorlösung (5 µL) auf 30 °C vortemperierte. Nach Zugabe des Inhibitors erfolgt eine weitere Inkubation bei 30 °C für 10 min. Danach wurde bei 30 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer Quarz Suparsil[®] Küvette (Ø 10 mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) mit Hilfe eines Lambda 20 Perkin-Elmer Photometers bei λ = 410 nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnte die prozentuale Hemmung der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.1.2: Assaybedingungen des Screenings gegen *Papain latex*.

<i>Papain latex</i> – Kontinuierlicher Assay			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	115 µL
Enzym	<i>Papain latex</i> (21.11 U/mg)	0.2 µM	15 µL
Substrat	Pyr-Phe-Leu-pNA, K _m (PL): 0.42 mM	0.6 mM	15 µL
Temperatur	30 °C		
Detektion	λ = 410 nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Inhibitoren	<i>E64c</i> - bzw. <i>CA028-like</i> - Alken-, -Diol-, -Epoxy-Tripeptide	30 µM	5 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

Zur Ermittlung der Aktivität der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (Inhibitoren) gegen *Papain latex* wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) lag bei 0.6 mM, die des Enzyms bei 0.2 µM und die der Inhibitoren bei 30 µM. Der Assay wurde in 115 µL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (15 µL) im Aktivatorpuffer (115 µL) für 5 min bei 30 °C. Zusätzlich wurde separat auch die Inhibitorlösung (5 µL) auf 30 °C vortemperiert. Nach Zugabe des Inhibitors erfolgt eine weitere Inkubation bei 30 °C für 5 min. Danach wurde bei 30 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suparsil®* Küvette (Ø 10mm), die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei λ = 410 nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnte die prozentuale Hemmung der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.1.3: Assaybedingungen des Screenings gegen *Cathepsin B*.

<i>Cathepsin B</i> – Kontinuierlicher Assay			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 6.0	200 mM	115 µL
Enzym	<i>Cathepsin B</i> (Bovine Spleen); 37.0 U/mg	0.3 µM	15 µL
Substrat	Z-Arg-Arg-pNA, K _m (CB): 0.68 mM	1.0 mM	15 µL
Temperatur	40 °C		
Detektion	λ = 410 nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Inhibitoren	<i>E64c</i> - bzw. <i>CA028-like</i> -Alken-, -Diol-, -Epoxy-Tripeptide	30 µM	5 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

Zur Ermittlung der Aktivität der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (Inhibitoren) gegen *Cathepsin B* wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Z-Arg-Arg-pNA) lag bei 1.0 mM, die des Enzyms bei 0.3 µM und die der Inhibitoren bei 30 µM. Der Assay wurde in 115 µL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.0 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (15 µL) im Aktivatorpuffer (115 µL) für 5 min bei 40 °C. Zusätzlich wurde separat auch die Inhibitorlösung (5 µL) auf 40 °C vortemperiert. Nach Zugabe des Inhibitors erfolgt eine weitere Inkubation bei 40 °C für 5 min. Danach wurde bei 40 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suprasil®* Küvette (Ø 10mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Z-Arg-Arg-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei $\lambda = 410$ nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnte die prozentuale Hemmung der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.1.4: Assaybedingungen des Screenings gegen *Cathepsin L*.

<i>Cathepsin L</i> – Kontinuierlicher Assay			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	NaCH ₃ COO ⁻ (340 mM), CH ₃ COOH (60 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 5.5	400 mM	115 µL
Enzym	<i>Cathepsin L (Human liver)</i> (6.354 mU/mg)	0.2 µM	15 µL
Substrat	Z-Phe-Arg-pNA, K _m (CL): 0.19 mM	0.5 mM	15 µL
Temperatur	30 °C		
Detektion	$\lambda = 410$ nm, Bandbreite 2 nm, 10 min		
Inhibitoren	<i>E64c</i> - bzw. <i>CA028-like</i> - Alken-, -Diol-, -Epoxy-Tripeptide	30 µM	5 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

Zur Ermittlung der Aktivität der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (Inhibitoren) gegen *Cathepsin L* wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Z-Phe-Arg-pNA) lag bei 0.5 mM, die des Enzyms bei 0.25 µM und die der Inhibitoren bei 30 µM. Der Assay wurde in 115 µL 400 mM Acetat-Puffer pH 5.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (15 µL) im Aktivatorpuffer (115 µL) für 5 min bei 30 °C. Zusätzlich wurde separat auch die Inhibitorlösung (5 µL) auf 30 °C vortemperiert. Nach Zugabe des Inhibitors erfolgt eine weitere Inkubation bei 30 °C für 10 min. Danach wurde bei 30 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suprasil* Küvette (Ø 10mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Z-Phe-Arg-pNA) mit Hilfe eines

Lambda 20 Perkin-Elmer Photometers bei $\lambda = 410$ nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnte die prozentuale Hemmung der Verbindungen ermittelt werden.

6.2.2 Kontinuierlicher Assay für die Bestimmung der IC_{50} -Werte

Tabelle 6.2.2.1: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des kontinuierlichen Assays gegen *Papain carica* für die Bestimmung der IC_{50} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

IC ₅₀ -Werte - <i>Papain Carica Papaya</i>			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	115 µL
Enzym	<i>Papain Carica Papaya</i> (3.11 U/mg)	1.0 µM	15 µL
Substrat	Pyr-Phe-Leu-pNA, K_m (PC): 0.38 mM	0.6 mM	15 µL
Temperatur	30 °C		
Detektion	$\lambda = 410$ nm, 10 min		
Inhibitor (557)	<i>CA028-like-(E)</i> -Alken- Asp-OH	50 nM – 160 µM	5 µL
Inhibitor (588)	<i>CA028-like-(R,R)</i> -Diol- Phg-OH	1 nM – 330 µM	5 µL
Inhibitor (617)	<i>CA028-like-(R,R)</i> -Epoxy-Ala-OH	0.3 nM – 20 µM	5 µL
Inhibitor (541)	<i>E64c-like-(E)</i> -Alken-Asp-OH	50 nM – 160 µM	5 µL
Inhibitor (567)	<i>E64c-like-(S,S)</i> -Diol-Leu-OH	1 nM – 330 µM	5 µL
Inhibitor (612)	<i>E64c-like-(rac)</i> -Epoxy-β-Fluor-Ala-OH	0.3 nM – 20 µM	5 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (**557**, **588**, **617**, **541**, **567**, **612**) gegen *Papain Carica Papaya* wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) lag bei 0.6 mM, die des Enzyms bei 1.0 µM und die der Inhibitoren zwischen 0.3 nM - 330 µM (Tabelle 6.2.2.1). Der Assay wurde in 115 µL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (15 µL) im Aktivatorpuffer (115 µL) für 5 min bei 30 °C. Zusätzlich wurde separat auch die Inhibitorlösung (5 µL) auf 30 °C vortemperierte. Nach der Zugabe des Inhibitors erfolgt eine weitere Inkubation bei 30 °C für 5 min. Danach wurde bei 30 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suparsil®* Küvette (Ø 10mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei λ

= 410 nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz und Konzentration durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnten die IC₅₀-Werte der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.2.2: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des kontinuierlichen Assays gegen *Papain latex* für die Bestimmung der IC₅₀-Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

IC ₅₀ -Werte - <i>Papain latex</i>			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	115 µL
Enzym	<i>Papain Latex</i> (21.11 U/mg)	1.0 µM	15 µL
Substrat	Pyr-Phe-Leu-pNA, K_m (PL): 0.42 mM	0.6 mM	15 µL
Temperatur	30 °C		
Detektion	λ = 410 nm, 10 min		
Inhibitor (557)	<i>CA028-like-(E)</i> -Alken- Asp-OH	50 nM – 160 µM	5 µL
Inhibitor (588)	<i>CA028-like-(R,R)</i> -Diol- Phg-OH	1 nM – 330 µM	5 µL
Inhibitor (617)	<i>CA028-like-(R,R)</i> -Epoxy-Ala-OH	0.3 nM – 20 µM	5 µL
Inhibitor (541)	<i>E64c-like-(E)</i> -Alken-Asp-OH	50 nM – 160 µM	5 µL
Inhibitor (559)	<i>E64c-like-(S,S)</i> -Diol-Leu-OtBu	1 nM – 330 µM	5 µL
Inhibitor (610)	<i>E64c-like-(S,S)</i> -Epoxy-Phg-OH	0.3 nM – 20 µM	5 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

Zur Ermittlung der IC₅₀-Werte der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (**557**, **588**, **617**, **541**, **559**, **610**) gegen *Papain latex* wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) lag bei 0.6 mM, die des Enzyms bei 0.2 µM und die der Inhibitoren zwischen 0.3 nM - 330 µM (Tabelle 6.2.2.2). Der Assay wurde in 115 µL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (15 µL) im Aktivatorpuffer (115 µL) für 5 min bei 30 °C. Zusätzlich wurde separat auch die Inhibitorlösung (5 µL) auf 30 °C vortemperiert. Nach der Zugabe des Inhibitors erfolgt eine weitere Inkubation bei 30 °C für 5 min. Danach wurde bei 30 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 Minuten in einer *Quarz Suparsil*® Küvette (Ø 10mm), die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei λ = 410 nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz und Konzentration durchgeführten drei Messungen

(Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnten die IC₅₀-Werte der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.2.3: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des kontinuierlichen Assays gegen *Cathepsin B* für die Bestimmung der IC₅₀-Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

IC ₅₀ -Werte – <i>Cathepsin B</i>			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 6.0	200 mM	115 µL
Enzym	<i>Cathepsin B</i> (Rinder Milz, 37 U/mg, 0.57 mg/ml)	0.3 µM	15 µL
Substrat	Z-Arg-Arg-pNA, K_m (CB): 0.67 mM	1.0 mM	15 µL
Temperatur	40 °C		
Detektion	λ = 410 nm, 10 min		
Inhibitor (557)	<i>CA028-like</i> -(<i>E</i>)-Alken- Asp-OH	50 nM – 160 µM	5 µL
Inhibitor (588)	<i>CA028-like</i> -(<i>R,R</i>)-Diol- Phg-OH	1 nM – 330 µM	5 µL
Inhibitor (617)	<i>CA028-like</i> -(<i>R,R</i>)-Epoxy-Ala-OH	0.3 nM – 20 µM	5 µL
Inhibitor (540)	<i>E64c-like</i> -(<i>E</i>)-Alken-Tyr-OH	50 nM – 160 µM	5 µL
Inhibitor (568)	<i>E64c-like</i> -(<i>S,S</i>)-Diol-Phg-OH	1 nM – 330 µM	5 µL
Inhibitor (613)	<i>E64c-like</i> -(<i>rac</i>)-Epoxy-Cha-OH	0.3 nM – 20 µM	5 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

Zur Ermittlung der IC₅₀-Werte der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (**557**, **588**, **617**, **540**, **568**, **613**) gegen *Cathepsin B* wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Z-Arg-Arg-pNA) lag bei 1.0 mM, die des Enzyms bei 0.3 µM und die der Inhibitoren zwischen 0.16 nM - 330 µM. Der Assay wurde in 115 µL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (15 µL) im Aktivatorpuffer (115 µL) für 5 min bei 40 °C. Zusätzlich wurde separat auch die Inhibitorlösung (5 µL) auf 40 °C vortemperiert. Nach Zugabe des Inhibitors erfolgt eine weitere Inkubation bei 40 °C für 5 min. Danach wurde bei 40 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 Minuten in einer *Quarz Suprasil®* Küvette (Ø 10mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Z-Arg-Arg-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei λ = 410 nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz und Konzentration durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnten die Hemmkonstanten und IC₅₀-Werte der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.2.4: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des kontinuierlichen Assays gegen *Cathepsin L* für die Bestimmung der IC_{50} -Werte der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

IC_{50}-Werte – <i>Cathepsin L</i>			
Assaymethode	Kontinuierlicher Assay	Konzentration	Volumen
Puffer	CH ₃ COONa (340 mM), CH ₃ COOH (60 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 5.5	400 mM	115 µL
Enzym	<i>Cathepsin L</i> (humane Leber, 6.35 mU/mg, 0.65 mg/ml)	0.25 µM	15 µL
Substrat	Z-Phe-Arg-pNA, K_m (CL): 0.19 mM	0.5 mM	15 µL
Temperatur	30 °C		
Detektion	λ = 410 nm, 10 min		
Inhibitor (557)	<i>CA028-like-(E)</i> -Alken-Asp-OH	50 nM – 160 µM	5 µL
Inhibitor (617)	<i>CA028-like-(R,R)</i> -Epoxy-Ala-OH	1 nM – 330 µM	5 µL
Inhibitor (537)	<i>E64c-like-(E)</i> -Alken-Phg-OH	0.3 nM – 20 µM	5 µL
Inhibitor (571)	<i>E64c-like-(R,R)</i> -Diol-Leu-Diol-OH	50 nM – 160 µM	5 µL
Inhibitor (568)	<i>E64c-like-(S,S)</i> -Diol-Phg-OH	1 nM – 330 µM	5 µL
Inhibitor (612)	<i>E64c-like-(rac)</i> -Epoxy-β-Fluor-Ala-OH	0.3 nM – 20 µM	5 µL
Volumina	115 µL [P], 15 µL [E], 15 µL [S], 5 µL [I]		

Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (**557**, **617**, **537**, **571**, **568**, **612**) gegen *Cathepsin L* wurde ein Screening unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Z-Phe-Arg-pNA) lag bei 0.5 mM, die des Enzyms bei 0.25 µM und die der Inhibitoren zwischen 0.3 nM - 330 µM (Tabelle 6.2.2.4). Der Assay wurde in 115 µL 200 mM Acetat-Puffer pH 5.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (15 µL) im Aktivatorpuffer (115 µL) für 5 min bei 30 °C. Parallel wird auch die Inhibitorlösung (5 µL) auf 30 °C vortemperiert. Nach Zugabe des Inhibitors erfolgt eine weitere Inkubation bei 30 °C für 5 min. Danach wurde bei 30 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suprasil* Küvette (Ø 10mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Z-Phe-Arg-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei λ = 410 nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz und Konzentration durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnten die IC_{50} -Werte der Verbindungen ermittelt werden.

6.2.3 Verdünnungsassay für die Bestimmung der Hemmkonstanten

Von den *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptiden (Inhibitoren), die im Screening eine Hemmung > 50% aufwiesen, wurde zum einen eine analoge Messung mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt und zum anderen wurden die Hemmkonstanten bestimmt: IC_{50} -, K_I -, k_I -, und k_{2nd} -Werte nach verschiedenen Inkubationszeiten. Unter zum Screening analogen Bedingungen (Temperatur, Puffer, Volumina, Detektion, Substrat- und Enzymkonzentration) wurde ein Verdünnungsassay durchgeführt.^[96,379] Diese aufwändigere Assaymethode wurde gewählt, da die Enzym-Substrat-Kurve nur über 25 min linear verlief und so mit einem kontinuierlichen Assay keine Möglichkeit gegeben war, die für die Inhibitoren erwartete irreversible und damit zeitabhängige Hemmung nachzuweisen. Der Test bei gleicher Inhibitorkonzentration und längerer Inkubationszeit sollte einen ersten Hinweis auf die Zeitabhängigkeit der Hemmung geben. Zur Bestimmung der Hemmkonstanten wurde die Enzymaktivität bei fünf verschiedenen Inhibitorkonzentrationen zwischen 0.1 μ M und 330 μ M bzw. 10 nM und 30 μ M (für stärker hemmende Verbindungen) und bei acht verschiedenen Inkubationszeiten (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 60 min) über 10 bzw. 5 min gemessen. Als Nullkontrolle diente eine Lösung, die nur DMSO enthielt. Für jede Substanz, Inkubationszeit und Konzentration wurden drei Messungen durchgeführt.

Tabelle 6.2.3.1: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des Verdünnungsassays gegen *Papain carica* für die Bestimmung der Hemmkonstanten der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

<i>Papain carica</i> - Bestimmung der Hemmkonstanten: K_I, k_I, k_{2nd}			
Assaymethode	Verdünnungsassay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	230 μ L
Enzym	<i>Papain carica papaya</i> (3.11 U/mg)	1.0 μ M	30 μ L
Substrat	Pyr-Phe-Leu-pNA, Km(PC): 0.38 mM	0.6 mM	30 μ L
Temperatur	25 °C		
Detektion	λ = 410 nm, 10 min		
Alken-Peptide	<i>E64c-like</i> -Asp (541); <i>CA028-like</i> -Asp (557)	0.1 - 30 μ M	10 μ L
Diol-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Leu (567); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Phg (588)	50 nM - 330 μ M	10 μ L
Epoxy-Peptide	<i>E64c-like</i> -(rac)- β -Fluor-Ala (612); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Ala (617)	10 nM - 30 μ M	10 μ L
Volumina	230 μ L [P], 30 μ L [E], 30 μ L [S], 10 μ L [I]		

Zur Ermittlung der Hemmkonstanten der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptiden (**541**, **557**, **567**, **588**, **612**, **617**) gegen *Papain carica* wurde ein Verdünnungsassay unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Pyr-Phe-

Leu-pNA) lag bei 0.6 mM, die des Enzyms bei 1.0 μM und die der Inhibitoren zwischen 10 nM - 330 μM (Tabelle 6.2.3.1). Der Assay wurde in 230 μL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (30 μL) im Aktivatorpuffer (230 μL) für 5 min bei 30 °C. Für jede Messreihe wurden 260 μL der Enzymlösung (*Papain carica*) und 10 μL des jeweiligen Inhibitors bei 25 °C inkubiert und im Abstand von jeweils 5 min Aliquots von 45 μL entnommen. Nach verdünnen der Aliquots mit 225 μL Puffer und Zugabe von 30 μL des Substrats wurde bei 25 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suparsil®* Küvette (\varnothing 10 mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei $\lambda = 410$ nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz, Inkubationszeit und Konzentration durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnten die K_i -, k_i -, k_{2nd} -Werte der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.3.2: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des Verdünnungsassays gegen *Papain latex* für die Bestimmung der Hemmkonstanten der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

<i>Papain latex</i> - Bestimmung der Hemmkonstanten: K_i, k_i, k_{2nd}			
Assaymethode	Verdünnungsassay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH_2PO_4 (200 mM), Na_2HPO_4 (200 mM), Na_2EDTA (1 mM), DTT (5 mM), pH 6.5	200 mM	230 μL
Enzym	<i>Papain Latex</i> (21.11 U/mg)	0.2 μM	30 μL
Substrat	Pyr-Phe-Leu-pNA, $K_m(\text{PL})$: 0.42 mM	0.6 mM	30 μL
Temperatur	25 °C		
Detektion	$\lambda = 410$ nm, 10 min		
Alken-Peptide	<i>E64c-like</i> -Asp (541); <i>CA028-like</i> -Asp (557)	0.1 - 30 μM	10 μL
Diol-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Leu (559); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Phg (588)	50 nM - 330 μM	10 μL
Epoxy-Peptide	<i>E64c-like</i> -(S,S)-Phg (610); <i>CA028-like</i> -(R,R)-Ala (617)	10 nM - 30 μM	10 μL
Volumina	230 μL [P], 30 μL [E], 30 μL [S], 10 μL [I]		

Zur Ermittlung der Hemmkonstanten der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptiden (**541**, **557**, **559**, **588**, **610**, **617**) gegen *Papain latex* wurde ein Verdünnungsassay unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Pyr-Phe-Leu-pNA) lag bei 0.6 mM, die des Enzyms bei 0.2 μM und die der Inhibitoren zwischen 10 nM - 330 μM (Tabelle 6.2.3.2). Der Assay wurde in 230 μL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (30 μL) im Aktivatorpuffer (230 μL) für 5 min bei 25 °C. Für jede Messreihe wurden 260 μL der Enzymlösung (*Papain latex*)

und 10 µL des jeweiligen Inhibitors bei 25 °C inkubiert und im Abstand von jeweils 5 min Aliquots von 45 µL entnommen. Nach Verdünnen der Aliquots mit 225 µL Puffer und Zugabe von 30 µL des Substrats wurde bei 25 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suparsil®* Küvette (Ø 10 mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Pyr-Phe-Leu-*p*NA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei 410 nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz und Konzentration durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnten die K_i -, k_i -, k_{2nd} -Werte der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.3.3: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des Verdünnungsassays gegen *Cathepsin B* für die Bestimmung der Hemmkonstanten der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

<i>Cathepsin B</i> - Bestimmung der Hemmkonstanten: K_i, k_i, k_{2nd}			
Assaymethode	Verdünnungsassay	Konzentration	Volumen
Puffer	KH ₂ PO ₄ (200 mM), Na ₂ HPO ₄ (200 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 6.0	200 mM	230 µL
Enzym	<i>Cathepsin B</i> (Bovine Spleen, 37 U/mg, 0.57 mg/ml)	0.3 µM	30 µL
Substrat	Z-Arg-Arg- <i>p</i> NA, K_m (CB): 0.67 mM	1.0 mM	30 µL
Temperatur	40 °C		
Detektion	λ = 410 nm, 10 min		
Alken-Peptide	<i>E64c-like</i> -Tyr (540); <i>CA028-like</i> -Asp (557)	0.1 - 30 µM	10 µL
Diol-Peptide	<i>E64c-like</i> -(<i>S,S</i>)-Phg (568); <i>CA028-like</i> -(<i>R,R</i>)-Phg (588)	50 nM - 330 µM	10 µL
Epoxy-Peptide	<i>E64c-like</i> -(<i>rac</i>)-Cha (613); <i>CA028-like</i> -(<i>R,R</i>)-Ala (617)	10 nM - 30 µM	10 µL
Volumina	230 µL [P], 30 µL [E], 30 µL [S], 10 µL [I]		

Zur Ermittlung der Hemmkonstanten der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (**540**, **557**, **568**, **588**, **613**, **617**) gegen *Cathepsin B* wurde ein Verdünnungsassay unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Z-Arg-Arg-*p*NA) lag bei 1.0 mM, die des Enzyms bei 0.3 µM und die der Inhibitoren zwischen 10 nM - 330 µM (Tabelle 6.2.3.3). Der Assay wurde in 230 µL 200 mM Phosphat-Puffer pH 6.0 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (30 µL) im Aktivatorpuffer (230 µL) für 5 min bei 40 °C. Für jede Messreihe wurden 45 µL der Enzymlösung (*Cathepsin B*) und 10 µL des jeweiligen Inhibitors bei 40 °C inkubiert und im Abstand von jeweils 5 min Aliquots von 45 µL entnommen. Nach Verdünnen der Aliquots mit 225 µL Puffer und Zugabe von 30 µL des Substrats wurde bei 40 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suparsil®* Küvette (Ø 10 mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-

Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Z-Phe-Arg-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei $\lambda = 410$ nm kontinuierlich detektiert. Durch den Vergleich der Mittelwerte aus den für jede Substanz, Inkubationszeit und Konzentration durchgeführten drei Messungen (Standardabweichung < 10%) zu einer Kontrolle, die anstatt der Inhibitorlösung nur DMSO enthielt, konnten die K_i -, k_i -, k_{2nd} -Werte der Verbindungen ermittelt werden.

Tabelle 6.2.3.4: Assaybedingungen (Enzym, Puffer und K_m -Wert) des Verdünnungsassays gegen *Cathepsin L* für die Bestimmung der Hemmkonstanten der *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide.

<i>Cathepsin L</i> - Bestimmung der Hemmkonstanten: K_i, k_i, k_{2nd}			
Assaymethode	Verdünnungsassay	Konzentration	Volumen
Puffer	CH ₃ COONa (340 mM), CH ₃ COOH (60 mM), Na ₂ EDTA (4 mM), DTT (8 mM), pH 5.5	400 mM	230 μ L
Enzym	<i>Cathepsin L</i> (Human Liver, 6.35 mU/mg, 0.65 mg/ml)	0.25 μ M	30 μ L
Substrat	Z-Phe-Arg-pNA, K_m (CL): 0.19 mM	0.5 mM	30 μ L
Temperatur	30 °C		
Detektion	$\lambda = 410$ nm, 10 min		
Alken-Peptide	<i>E64c-like</i> -Phg (537); <i>CA028-like</i> -Asp (557)	0.1 - 30 μ M	10 μ L
Diol-Peptide	<i>E64c-like</i> -(<i>R,R</i>)-Leu (571); <i>E64c-like</i> -(<i>S,S</i>)-Phg (568)	50 nM - 330 μ M	10 μ L
Epoxy-Peptide	<i>E64c-like</i> -(<i>rac</i>)- β -Fluor-Ala (612); <i>CA028-like</i> -(<i>R,R</i>)-Ala (617)	10 nM - 30 μ M	10 μ L
Volumina	230 μ L [P], 30 μ L [E], 30 μ L [S], 10 μ L [I]		

Zur Ermittlung der Hemmkonstanten der *E64c*- bzw. *CA028-like*-Tripeptide (**537**, **557**, **568**, **571**, **612**, **617**) gegen *Cathepsin L* wurde ein Verdünnungsassay unter den vorher ermittelten Assaybedingungen durchgeführt. Die Endkonzentration des Substrats (Z-Phe-Arg-pNA) lag bei 0.5 mM, die des Enzyms bei 0.25 μ M und die der Inhibitoren zwischen 10 nM - 330 μ M (Tabelle 6.2.3.4). Der Assay wurde in 230 μ L 200 mM Acetat-Puffer pH 5.5 durchgeführt. Zuerst erfolgt die Vorinkubation des Enzyms (30 μ L) im Aktivatorpuffer (230 μ L) für 5 min bei 30 °C. Für jede Messreihe wurden 260 μ L der Enzymlösung (*Cathepsin L*) und 10 μ L des jeweiligen Inhibitors bei 30 °C inkubiert und im Abstand von jeweils 5 min Aliquots von 45 μ L entnommen. Nach Verdünnen der Aliquots mit 225 μ L Puffer und Zugabe von 30 μ L des Substrats wurde bei 30 °C (Einhaltung der Temperaturkonstanz mit Temperatursensor und Kontrolleinheit) über einen Zeitraum von 10 min in einer *Quarz Suparsil®* Küvette (\varnothing 10 mm) die Zunahme der Absorption durch das Spaltprodukt (*p*-Nitroanilin) der enzymatischen Hydrolyse des Substrats (Z-Phe-Arg-pNA) mit Hilfe eines *Lambda 20 Perkin-Elmer* Photometers bei $\lambda = 410$ nm kontinuierlich detektiert.

6.3 Experimentelle Details zur Durchführung antibakterieller Testierungen

Versuchsprotokoll zur Durchführung antibakterieller Testierungen (Nicole Sattler, TU Berlin, Deutschland).

Bestimmung der Hemmhofdurchmesser ausgewählter Verbindungen gegen Gram-positive und Gram-negative Erreger im direkten Vergleich zu den Referenzantibiotika.

Verwendete Bakterien-Stämme

<i>Bacillus subtilis</i> Sporen ATCC 6633	[gram. Pos.]	DSMZ 1	30°C
<i>Escherichia coli</i> K12 (W1130)	[gram. Neg.]	KM1	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	[gram. Pos.]	KM1	37°C
<i>Mycobacterium phlei</i> DSM 750	[gram. Pos.]	KM1	30°C

Eingesetzte Referenzantibiotika und Medien

Antibiotikum	Organismus
Apramycin	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol	<i>S. aureus</i>
Kanamycin	<i>M. phlei</i>
Streptomycin	<i>M. phlei</i>

KM1- Medium

Bacto Nutrient Broth (Difco)	8 g
Agar	15 g
NaCl	5 g
Aqua deion.	1 L
pH	7.2

DSMZ-Medium 1 (Nutrient Agar für *Bacillus*)

Bacto Peptone (Difco)	5 g
Agar	15 g
Malzextrakt	3 g
MnSO ₄ x H ₂ O	10 mg
Aqua deionisiert	1 L
pH	7.0

NB-Weichagar

Bacto Nutrient Broth (Difco)	8 g
Agar	5 g
Aqua deion.	1 L

Konservierung

Abzentrifugieren von 1,5 ml einer Übernachtskultur, der Überstand wird verworfen und für die Glycerinkulturen 200 ml Medium und 300 ml Glycerin 85% hinzugeben und bei - 80 °C gelagert.

Sporenerstellung von *B. subtilis* Sporen

100 ml DSMZ1-Medium werden mit *B. subtilis* Zellen beimpft und für vier bis fünf Tage bei 120 rpm und 30°C inkubiert. Die Sporenbildung wird mit Hilfe des Mikroskops verfolgt. Das Abernten der Sporen erfolgt ab dem Zeitpunkt des Wachstums, an welchem überwiegend bzw. ausschließlich Sporen vorhanden sind. Die Kultur wird für 10 min bei 5000 g abzentrifugiert und anschließend das Zellpellet mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt und am Ende wird das Pellet in sterilem Leitungswasser aufgenommen (OD₅₄₆ sollte bei 1,5 liegen). Zum Abtöten der restlichen noch vegetativen Zellen wird die Sporensuspension für 45 min bei 70 °C erhitzt. Die Lagerung erfolgt bei – 20 °C im Gefrierschrank.

Durchführung des Agar-Diffusionstests**Ansetzen der Übernachtskulturen von *E. coli*, *M. phlei* und *S. aureus***

Es werden 20 ml Medium mit 20 µl der Kryokultur und 3-5 Kolonie angesetzt, oder man verwendet für den Ansatz 5 ml Medium im Reagenzglas mit 3-5 Kolonien gleichen Aussehens.

Einstellen des Inokulums von *E. coli*, *M. phlei* und *S. aureus*

Das im Test einzusetzende Inokulum wird nachdem 0.5 McFarland-Standard mit einer OD₆₂₅ von 0.08 –0.1 eingestellt. Eine entsprechende Suspension enthält ca. 1 - 2 x 10⁸ CFU/ml. Im späteren Testansatz sollen 1 x 10⁷ CFU/ml enthalten sein.

Präparation der Agarplatten für den Test

a) Testplatten von *E. coli*, *M. phlei* und *S. aureus*

In 10 ml Portionen wird der KM1-Agar in Standard Petrischalen (Ø 94 mm) gegossen. Die Platten können nach dem Erstarren für mehrere Tage bei 4°C gelagert werden. Die KM1-Platten werden mit 4 ml flüssigem KM1-Agar und 100 µl der eingestellten Teststamm-suspension (1×10^7 CFU/ml) überschichtet. Hierbei ist darauf zu achten, dass der flüssige Agar nach dem Erhitzen wieder auf „Handwärme“ abgekühlt ist. Zum besseren Aufbringen des beimpften Agars empfiehlt es sich, die KM1-Platten im Heizschrank vorzuwärmen, da sich die beiden Agarschichten so besser verbinden und es nicht zu Unebenheiten auf dem Agar kommt. Nach dem Erstarren sind die Platten gebrauchsfertig und sollten innerhalb der nächsten drei Stunden verwendet werden.

b) Testplatten von *B. subtilis*

In 10 ml Portionen gießt man den DSMZ1-Agar in Standard Petrischalen (Ø 94 mm). Die Platten können nach dem Erstarren für mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden. Die DSMZ1-Platten werden mit 4 ml NB-Weichagar und 20 µl der *B. subtilis* Sporensuspension überschichtet. Hierbei muss man wiederum darauf achten, dass der flüssige NB-Weichagar nach dem Erhitzen wieder auf eine Temperatur von < 65 °C abgekühlt ist. Zum besseren Aufbringen des beimpften NB-Weichagars empfiehlt es sich auch hier, die DSMZ1-Platten im Heizschrank vorzuwärmen, da sich die beiden Agarschichten so besser verbinden und es nicht zu Unebenheiten auf dem Agar kommt. Nach dem Erstarren sind die Platten gebrauchsfertig und sollten innerhalb der nächsten 3 Stunden benutzt werden.

Aufbringen der Antibiotika-Testblättchen und der Proben

Auf jede einzelne Agarplatte werden sechs sterile Antibiotika-Testblättchen (jeweiliges Antibiotikum) in einem Radius von 2.8 cm kreisförmig auf den Agar aufgebracht und mit 10 µl der Probe beschickt. Von jeder Probe wurden 10 mg Probenmaterial in 1 ml DMSO gelöst. Die beiden Konzentrationen (5 mg und 1 mg) wurden aus den jeweiligen Stammlösungen mit sterilem Aqua dest. verdünnt. Dies entspricht folgenden Endkonzentrationen (mg) im Test: 0.1 mg, 0.05 mg, 0.01 mg. Die bestückten Agarplatten werden anschließend für ca. 18 Stunden je nach Inkubationstemperatur im Brutschrank inkubiert.

Bestimmung der Zellzahl von *E. coli*, *M. phlei* und *S. aureus*

Von jedem Stamm werden 100 µl der Verdünnungen 10^{-6} und 10^{-7} aus dem eingestellten standardisierten Inokulum ($OD_{625} 0.8 - 0.1$) auf KM1-Agar ausplattiert. Die Herstellung der Verdünnungen erfolgt mit KM1-Medium. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 6.3.1: Antibakterieller Assay der synthetischen Intermediate; Berechnung: CFU/ml = Kolonien x Verdünnung x 10.

Stamm	Kolonien Verdünnung 10^6	Kolonien Verdünnung 10^7	Zellzahl [CFU/ ml]
<i>E. coli</i>	17	1	$1,7 \times 10^8$
	12	3	
<i>M. phlei</i>	7	3	$1,9 \times 10^8$
	7	3	
<i>S. aureus</i>	13	4	$2,0 \times 10^8$
	17	1	

Tabelle 6.3.2: Antibakterieller Assay der Tripeptid-Inhibitoren; Berechnung: CFU/ml = Kolonien x Verdünnung x 10.

Stamm	Kolonien Verdünnung 10^6	Kolonien Verdünnung 10^7	Zellzahl [CFU/ ml]
<i>E. coli</i>	17	1	$1,0 \times 10^8$
	12	3	
<i>M. phlei</i>	7	3	$0,8 \times 10^8$
	7	3	
<i>S. aureus</i>	13	4	$1,0 \times 10^8$
	17	1	

Auswertung der Testierungen

Die Auswertung der Testierung erfolgt Anhand des Ausmessens des Durchmessers der vorhandenen Hemmhöfe, Abfotografieren der Platten und durch Bestimmung der Zellzahl von *E. coli*, *M. phlei* und *S. aureus*.

Tabelle 6.3.3: Hemmhofdurchmesser [cm] der synthetischen Intermediate im antibakterielle Screening: Rot unterlegt sind die Hemmhofdurchmesser [cm] der aktivsten Verbindungen. Gelblich unterlegt sind die Hemmhofdurchmesser [cm] der mäßig aktiven, und bräunlich die Verbindungen welche zwar antibakterielle Aktivitäten aufwiesen (10mg/ml), jedoch erst ab physiologisch irrelevanten Konzentrationen.

Hemmhof Durchmesser [cm]	<i>B. subtilis</i>			<i>E. coli</i>			<i>M. phlei</i>			<i>S. aureus</i>		
	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
452	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
450	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
444	-	0,9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
446	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
443	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9
448	-	-	0,9	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
423	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
431	-	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
407	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

411	-	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
413	-	1	1	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
426	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
433	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
416	-	0,9	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
428	-	0,9	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
425	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
421	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
422	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
437	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
436	-	-	-	-	-	-	-	0,8	0,9	-	0,8	0,9
419	0,8	0,9	0,9	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
404	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
424	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
412	0,9	1,4	1,7	-	-	0,9	-	0,9	1,2	-	-	-
406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
408	-	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
415	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
455	-	-	-	-	-	0,9	-	-	0,8	-	-	-
456	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-
457	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
463	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
464	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
462	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
466	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
468	0,7	0,9	1	-	-	-	-	0,8	0,8	-	-	-
458	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
461	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
459	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
460	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
DMSO 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apramycin	1,5	n.b.	n.b.	1,7	n.b.	n.b.	2,0	n.b.	n.b.	1,4	n.b.	n.b.
Chloramphenicol	2,5	n.b.	n.b.	1,7	n.b.	n.b.	1,5	n.b.	n.b.	1,8	n.b.	n.b.
Kanamycin	1,8	n.b.	n.b.	1,9	n.b.	n.b.	2,4	n.b.	n.b.	1,7	n.b.	n.b.
Tetracyclin	3	n.b.	n.b.	2,3	n.b.	n.b.	2,1	n.b.	n.b.	2,2	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 6.3.4: Hemmhofdruchmesser [cm] ausgewählter *E64c*- und *CA028-like*-Tripeptide im antibakterielle Screening: Rot unterlegt sind die Hemmhofdruchmesser [cm] der aktivsten Verbindungen.

Hemmhof Ø [cm]	<i>B. subtilis</i>			<i>E. coli</i>			<i>M. Phlei</i>			<i>S. aureus</i>		
	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
529	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
532	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
568	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
592	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-
572	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
573	-	-	-	-	-	-	-	0,9	1,0	-	-	-
598	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

546	-	0,8	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
553	-	-	-	-	-	1,0	-	0,9	1,0	-	-	-
548	2,7	3,0	> 3,0	-	-	-	-	0,9	1,0	2	3	3,5
580	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
582	-	1,0	1,3	-	0,8	0,9	0,8	1,0	1,1	-	-	1,3
599	-	1,1	1,4	-	1,0	1,5	0,8	1,0	1,5	-	-	1,5
602	-	1,3	1,5	-	1,0	1,5	0,9	1,0	1,2	-	1,0	1,5
604	-	1,0	1,3	-	0,8	1,7	0,8	1,0	1,1	-	-	1,2
543	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
601	-	0,8	1,2	-	-	1,1	-	0,9	1,1	-	-	-
DMSO 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apramycin	2,7	n.b.	n.b.	1,7	n.b.	n.b.	2,0	n.b.	n.b.	1,5	n.b.	n.b.
Chloramphenicol	2,8	n.b.	n.b.	2,2	n.b.	n.b.	1,5	n.b.	n.b.	2,8	n.b.	n.b.
Kanamycin	2,9	n.b.	n.b.	2,1	n.b.	n.b.	2,3	n.b.	n.b.	1,8	n.b.	n.b.
Tetracyclin	2,8	n.b.	n.b.	2,0	n.b.	n.b.	2,2	n.b.	n.b.	3,0	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

6.4 Experimentelle Details zur Durchführung der *in vitro*-Assays

6.4.1 Enniatin-Synthetase *in vitro*-Assay

Versuchsprotokoll zur Durchführung der *in vitro*-Assays für ESyn (PD Dr. Rainer Zocher, TU Berlin, Deutschland).

Die Enzymassays wurde gemäß der von Zocher *et al.* beschriebenen Methode durchgeführt.^[283] Das aufgereinigte Enzym (Esyn) wurde in Anwesenheit von ATP (5 mM), MgCl₂ (10mM), L-Valin (2 mM), [¹⁴C-methyl]-AdoMet (0.5 µCi, 60 Ci mol⁻¹) und der jeweiligen synthetischen α-D-Hydroxysäure (2 mM) für 1 h bei 25 °C inkubiert. Das finale Volumen der Reaktionslösung betrug 125 µl. Die Reaktion wurde mit 2 ml Wasser gestoppt, und anschließend mit 2 ml Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 50 µl EtOAc aufgenommen und für die folgende Dünnschichtchromatographie eingesetzt (EtOAc/MeOH/H₂O; 100:5:1). Für die enzymkinetische Bestimmung der k_{cat}-Werte wurden die Anfangsgeschwindigkeiten (v_i) in unterschiedlichen Zeitabständen nach 2, 4, 6, 8 und 10 min bestimmt. Jeweils 10 µl der entnommen Enzymlösung wurde mit 1 ml Wasser verdünnt, und mit 2 ml EtOAc extrahiert. Davon wurden 400 µl in 4 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst und die Aktivität in cpm am Szintillationszähler gemessen. Die radiomarkierten Verbindungen wurden mittels Autoradiographie entweder durch Konica Röntgenfilme oder Radioscan (Berthold linear tlc analyser) analysiert. Die Bildung der natürlichen und neuen Enniatin-Derivate wurde jeweils mit LC-MS-Analytik nachgewiesen. Eine weiterführende Charakterisierung der Enniatine erfolgte mittels MS/MS-Analytik.

6.4.2 PF-Synthetase *in vitro*-Assay

Versuchsprotokoll zur Durchführung der *in vitro*-Assays für PFSyn (Dipl.-Chem. Jane Müller, TU Berlin, Deutschland).

Der Enzymassay wurde gemäß der von Zocher *et al.* beschriebenen Methode durchgeführt.^[283] In Anwesenheit von ATP (5 mM), MgCl₂ (10mM), L-Leucin (1 mM) und ¹⁴C-markiertem AdoMet (2.5 mM) wurden 100 - 200 µl einer PFSyn-haltigen Lösung mit D-Lac (8 mM), D-PheLac (2 mM) für die natürlichen PF 1022A Verbindungen oder für die entsprechenden synthetischen α-D-Hydroxysäuren (3 mM) für die PF-Derivate inkubiert. Nach 30 min wurde 1 ml Wasser zugesetzt und mit 2 ml Ethylacetat extrahiert. 100 µl der abgetrennten organischen Phase wurde für die Szintillationsmessungen entnommen und die restliche Lösung wurde für die anschließende Dünnschichtchromatographie verwendet. Für die enzymkinetischen Messungen wurde nach 2, 4, 6, 8 und 10 min je 10 µl der Enzymlösung entnommen, mit 1 ml Wasser verdünnt und 2 ml EtOAc extrahiert. Davon wurden 400 µl in 4 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst und die Aktivität am Szintillationszähler gemessen. Nach 30 min wurde die restliche Enzymlösung mit 1 ml Wasser, 2 ml EtOAc versetzt und mittels zweimaligem (30 sec.) vortexen extrahiert. 100 µl der organischen Phase wurden in 4 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst und die Aktivität in cpm gemessen. Die organische Phase wurde abgenommen und die wässrige Phase ein weiteres Mal mit 1 ml EtOAc extrahiert. Der Rest der vereinigten organischen Phasen wurden eingengt, folgend in 50 µl EtOAc wieder aufgenommen und mittels DC analysiert (CHCl₃/EtOAc; 2:1). Von jeder DC-Platte wurde ein Radioscan sowie ein Autoradiogramm zur Reaktionskontrolle erstellt. Die Bildung der natürlichen und neuen PF 1022-Derivate wurde jeweils mit LC-MS-Analytik nachgewiesen, und weiterführend mittels MS/MS-Analytik charakterisiert.

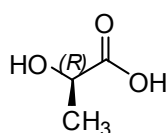
6.5 Synthesevorschriften und analytische Daten der einzelnen Verbindungen

Im Folgenden sind in chronologischer Reihenfolge sämtliche Synthesevorschriften und Analytikdaten relevanter Verbindungen aufgezeigt. Hydroxysäurebausteine für die *In vitro*-Synthese von Enniatin-, und PF 1022-Derivaten sind lediglich anhand von ¹H-, ¹³C-NMR, EI-MS, HRMS und IR Daten belegt. Für einzelne Substanzbibliotheken werden die Reaktionsbedingungen in einer allgemeinen Synthesevorschrift angegeben. Experimentelle Abweichungen so wie Umsatzraten für die einzelnen Substanzen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der α -D-Hydroxysäuren (258 - 307)

Zu einer α -Aminosäure (10 mmol) in 0.5 M H_2SO_4 (40 ml, 20 mmol), wird bei 0 °C eine Lösung aus NaNO_2 (60 mmol) in H_2O (13.5 ml) sehr langsam zugesetzt. Die Temperatur muss während der Zugabe von NaNO_2 unter 5 °C gehalten werden. Die Reaktionslösung wird für weitere 3 h bei 0 °C gerührt. Daraufhin lässt man die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur kommen und rührt sie für weiter 24 h. Danach wird die Reaktionslösung dreimal mit Diethylether (50 ml) extrahiert und mit ges. Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wird abfiltriert und die flüchtigen Komponenten werden unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether).

(*R*)-2-Hydroxypropionsäure (258). D-Alanin (1782 mg, 20.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (40.0



mmol, 80.0 ml), NaNO_2 (8279 mg, 120.0 mmol) in 27.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 942 mg (52%) **258** als gelbliches Öl.

Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39.4$ ($c = 1.0$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3206, 2990, 2943, 1729, 1455, 1277, 1203, 1124, 1096, 1043.

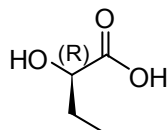
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 1.21 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 4.02 (q, $J = 6.90$ Hz, 1H), 7.86 (br s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 20.5, 65.8, 176.3.

MS (EI) m/z 90 (M^+), 74, 58, 46.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (M^+) 90.0316; gef. 90.0329.

(*R*)-2-Hydroxybuttersäure (259). D-2-Aminobuttersäure (1000 mg, 7.2 mmol), 0.5 M H_2SO_4



(14.4 mmol, 30.0 ml), NaNO_2 (2980 mg, 43.2 mmol) in 9.7 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 643 mg (86%) **259** als gelblichen Feststoff.

Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9.8$ ($c = 1.05$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3449, 2971, 2939, 2883, 1718, 1460, 1238, 1214, 1128, 1059.

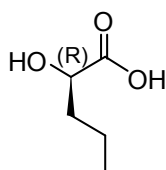
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.86 (t, $J = 7.46$ Hz, 3H), 1.46 - 1.53 (m, 1H), 1.57 - 1.69 (m, 1H), 3.86 (dd, $J = 7.19, 4.77$ Hz, 1H), 5.05 (br s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 9.5, 27.1, 70.7, 175.7.

MS (EI) m/z 105 ($\text{M}+\text{H}^+$), 87, 77, 59.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_4H_9O_3$ ($M+H$)⁺ 105.0551; gef. 105.0559.

(R)-2-Hydroxypentansäure (260). D-Norvalin (1175 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), $NaNO_2$ (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 935 mg (80%) **260** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +16.5$ ($c = 1.21$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3319, 2963, 2936, 2876, 1722, 1467, 1255, 1216, 1132, 1075.

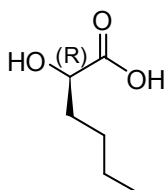
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.86 (t, $J = 7.32$ Hz, 3H), 1.29 - 1.38 (m, 2H), 1.44 - 1.61 (m, 2H), 3.90 (dd, $J = 7.79, 4.57$ Hz, 1H), 5.06 (br s, 1H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 13.7, 18.0, 36.1, 69.3, 176.0.

MS (EI) m/z 119 (M^+)⁺, 100, 73, 55.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_5H_{11}O_3$ (M^+)⁺ 119.0708; gef. 119.0712.

(R)-2-Hydroxyhexansäure (261). D-Norleucin (1000 mg, 7.6 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (15.2 mmol, 31.0 ml), $NaNO_2$ (3154 mg, 45.7 mmol) in 10.3 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 790 mg (78%) **261** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +9.8$ ($c = 1.50$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3459, 2957, 2930, 2874, 2862, 1731, 1467, 1460, 1271, 1242, 1208, 1134, 1087, 1066, 1056.

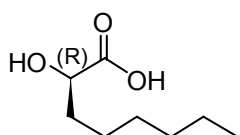
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.85 (t, $J = 7.19$ Hz, 3H), 1.21 - 1.34 (m, 4H), 1.44 - 1.53 (m, 2H), 1.56 - 1.64 (m, 2H), 3.89 (dd, $J = 7.79, 4.57$ Hz, 1H), 5.06 (br s, 1H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 13.9, 21.9, 26.9, 33.6, 69.6, 175.9.

MS (EI) m/z 132 (M^+)⁺, 103, 87, 76, 69, 57.

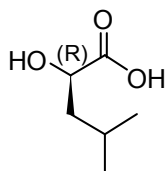
HRMS (EI) m/z ber. für $C_6H_{12}O_3$ (M^+)⁺ 132.0786; gef. 132.0782.

(R)-2-Hydroxyoctansäure (262). D-2-Aminooctansäure (1260 mg, 7.9 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), $NaNO_2$ (2608 mg, 37.8 mmol) in 8.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 913 mg (72%) **262** als weißen Feststoff.



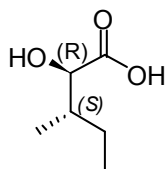
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +9.5$ ($c = 0.84$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3454, 2954, 2921, 2872, 2857, 1736, 1468, 1457, 1257, 1221, 1189, 1136, 1121, 1091.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.84 (t, $J = 7.21$ Hz, 3H), 1.23 - 1.35 (m, 8H), 1.44 - 1.53 (m, 1H), 1.56 - 1.63 (m, 1H), 3.89 (dd, $J = 7.52, 4.57$ Hz, 1H), 5.05 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 13.9, 22.0, 24.6, 28.4, 31.2, 33.9, 69.6, 175.9.
MS (EI)	m/z 161 ($\text{M}+\text{H}^+$), 133, 115, 97, 69, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 161.1177; gef. 161.1182.

(R)-2-Hydroxy-4-methyl-valeriansäure (263). D-Leucin (1312 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO_2 (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 1175 mg (89%) **6** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +12.1$ ($c = 0.95$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3186, 2959, 2938, 2872, 1723, 1470, 1456, 1388, 1369, 1266, 1217, 1141, 1086.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.86 (t, $J = 7.18$ Hz, 6H), 1.35 - 1.147 (m, 2H), 1.68 - 1.79 (m, 1H), 3.93 (dd, $J = 8.73, 4.84$ Hz, 1H), 5.06 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.5, 23.2, 23.9, 42.9, 68.2, 176.4.
MS (EI)	m/z 132 (M^+), 113, 99, 87, 76, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$ (M^+) 132.0786; gef. 132.0788.

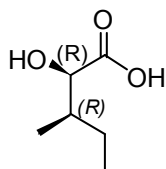
(allo)-(R)-2-Hydroxy-3-methyl-valeriansäure (264). *Allo*-D-Isoleucin (1000 mg, 7.6 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (15.2 mmol, 30.5 ml), NaNO_2 (3155 mg, 45.7 mmol) in 10.3 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 725 mg (72%) **264** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -5.3$ ($c = 0.15$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3435, 3170, 2965, 2937, 2879, 1720, 1463, 1382, 1365, 1336, 1249, 1217, 1139, 1113, 1049, 1020.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.76 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 0.85 (t, $J = 7.46$ Hz, 3H), 1.11 - 1.22 (m, 1H), 1.34 - 1.45 (m, 1H), 1.64 - 1.70 (m, 1H), 3.89 (d, $J = 3.63$ Hz, 1H), 3.91 (br s, 1H).

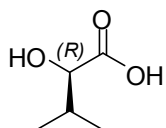
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 11.7, 13.8, 25.6, 37.9, 72.1 175.8.
MS (EI)	m/z 133 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 115, 105, 97, 87, 76, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 133.0864; gef. 133.0863.

(R)-2-Hydroxy-3-methyl-valeriansäure (265). D-Isoleucin (1000 mg, 7.6 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (15.3 mmol, 30.5 ml), NaNO_2 (3155 mg, 45.7 mmol) in 10.3 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 830 mg (82%) **265** als weißen Feststoff.



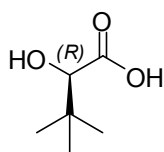
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.8$ ($c = 1.05$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3314, 2966, 2937, 2879, 1718, 1649, 1463, 1381, 1273, 1242, 1216, 1135, 1071, 1045, 1018.
^1H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.81 (d, $J = 7.52$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.98$ Hz, 3H), 1.08 - 1.19 (m, 1H), 1.34 - 1.47 (m, 1H), 1.61 - 1.70 (m, 1H), 3.76 (d, $J = 4.97$ Hz, 1H), 4.97 (br s, 1H).
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 11.5, 15.4, 23.7, 38.1, 74.0, 175.4.
MS (EI)	m/z 133 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 115, 99, 87, 76, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 133.0864; gef. 133.0862.

(R)-2-Hydroxy-3-methyl-buttersäure (266). D-Valin (1175 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO_2 (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 974 mg (82%) **266** als weißen Feststoff.



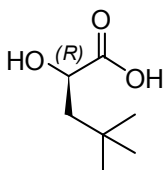
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.3$ ($c = 1.2$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3423, 3171, 2967, 2936, 2878, 1720, 1468, 1390, 1371, 1254, 1215, 1178, 1137, 1066, 1028.
^1H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.80 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 1.88 - 1.95 (m, 1H), 3.72 (d, $J = 4.57$ Hz, 1H), 4.99 (br s, 1H).
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 16.8, 18.9, 31.4, 74.5, 175.3.
MS (EI)	m/z 119 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 99, 85, 76, 73, 58, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 119.0708; gef. 119.0710.

(R)-2-Hydroxy-3,3-dimethyl-butansäure (267). D-*tert*-Butyl-glycin (1000 mg, 7.6 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (15.2 mmol, 30.5 ml), NaNO₂ (3158 mg, 45.7 mmol) in 10.3 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 887 mg (88%) **267** als weißen Feststoff.



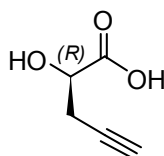
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -7.9$ ($c = 0.82$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3350, 2962, 2912, 2875, 1716, 1480, 1466, 1398, 1370, 1279, 1218, 1181, 1082, 1023.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.80 – 1.08 (m, 2H), 1.11 – 1.20 (m, 3H), 1.40 – 1.44 (m, 2H), 1.60 – 1.75 (m, 2H), 3.94 – 3.97 (m, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 25.7, 25.9, 26.1, 31.8, 67.6, 176.4.
MS (EI)	m/z 133 (M+H) ⁺ , 117, 99, 87, 76, 69, 57, 46.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₆ H ₁₂ O ₃ (M+H) ⁺ 133.0864; gef. 133.0868.

(R)-2-Hydroxy-4,4-dimethyl-pentansäure (268). D-*tert*-Butylalanin (1000 mg, 6.9 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (13.8 mmol, 28.0 ml), NaNO₂ (2856 mg, 41.4 mmol) in H₂O (9.4 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 635 mg (63%) **268** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +8.1$ ($c = 1.18$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3411, 2964, 2954, 2922, 2870, 1710, 1464, 1447, 1427, 1394, 1370, 1366, 1255, 1242, 1189, 1080, 1052, 1031.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.91 (s, 9H), 1.36 – 1.42 (m, 1H), 1.53 – 1.57 (m, 1H), 3.97 (dd, $J = 8.93, 3.02$ Hz, 1H), 4.99 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 29.8, 30.1, 47.2, 68.1, 176.7.
MS (EI)	m/z 147 (M+H) ⁺ , 119, 113, 101, 95, 83, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₇ H ₁₅ O ₃ (M+H) ⁺ 147.1021; gef. 147.1027.

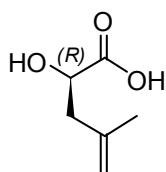
(R)-2-Hydroxypentinsäure (269). D-Propargyl-glycin (1000 mg, 8.9 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (17.8 mmol, 36.0 ml), NaNO₂ (3684 mg, 53.4 mmol) in 12.1 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 745 mg (73%) **269** als braunen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +6.1$ ($c = 1.7$, MeOH).
-----------------	---

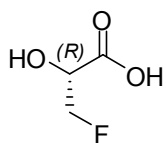
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3290, 2926, 2633, 2122, 1726, 1422, 1361, 1329, 1283, 1205, 1093, 1027.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.32 – 2.42 (m, 2H), 2.71 (t, J = 2.69 Hz, 1H), 3.98 (dd, J = 6.45, 5.37 Hz, 1H), 5.43 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 24.2, 68.7, 72.7, 80.9, 173.9.
MS (EI)	m/z 115 (M+H) ⁺ , 109, 97, 91, 87, 81, 69, 53.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₅ H ₇ O ₃ (M+H) ⁺ 115.0395; gef. 115.0402.

(R)-2-Hydroxy-4-methyl-4-pentensäure (270). D-4,5-Dehydro-leucin (1000 mg, 7.7 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (15.5 mmol, 31.0 ml), NaNO₂ (3204 mg, 46.4 mmol) in 10.5 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 450 mg (45%) **270** als weißen Feststoff.



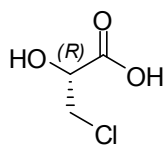
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.8$ ($c = 0.40$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3290, 2926, 2637, 2117, 1726, 1445, 1359, 1329, 1254, 1088, 1006.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.71 (s, 3H), 3.46 – 3.49 (m, 2H), 4.06 – 4.08 (m, 1H), 4.71 – 4.75 (m, 1H), 7.78 – 7.81 (m, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 22.5, 42.2, 68.9, 112.8, 138.1, 175.6.
MS (EI)	m/z 129 (M) ⁺ , 112, 95, 85, 68, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₆ H ₉ O ₃ (M) ⁺ 129.0551; gef. 129.0550.

3-Fluor-(R)-2-hydroxypropionsäure (271). β -Fluor-D-Alanin (250 mg, 2.3 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (4.7 mmol, 9.4 ml), NaNO₂ (969 mg, 14.0 mmol) in 3.2 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 125 mg (49%) **271** als gelbliches Öl.



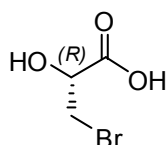
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4.2$ ($c = 0.18$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3378, 3196, 2966, 2925, 2855, 2619, 2564, 1731, 1561, 1459, 1418, 1379, 1237, 1208, 1122, 1063, 999, 892, 847, 777.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 4.20 (dd, J = 4.30, 2.96 Hz, 0.5H), 4.27 (dd, J = 4.30, 2.96 Hz, 0.5H), 4.45 – 4.52 (m, 1H), 4.57 – 4.63 (m, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 69.6, 69.8, 84.3, 85.9, 172.4, 172.5.
MS (EI)	m/z 109 (M+H) ⁺ , 109, 92, 72, 63, 46.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₃ H ₅ FO ₃ (M+H) ⁺ 109.0301; gef. 109.0293.

3-Chlor-(R)-2-hydroxypropionsäure (272). β -Chlor-D-Alanin (1000 mg, 6.3 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (12.5 mmol, 25.0 ml), NaNO_2 (2587 mg, 37.5 mmol) in 8.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 490 mg (63%) **272** als weißen Feststoff.



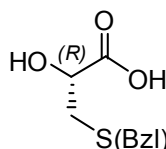
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.21$ ($c = 1.22$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3181, 2976, 2930, 2607, 1731, 1430, 1369, 1276, 1184, 1099, 910, 678.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 3.75 (d, $J = 4.43$ Hz, 2H), 4.29 (t, $J = 4.43$ Hz, 1H), 5.69 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 47.2, 70.1, 172.5.
MS (EI)	m/z 125 ($\text{M}+\text{H}^+$), 108, 92, 81, 79, 75, 63, 49.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 125.0005; gef. 125.0007.

3-Brom-(R)-2-hydroxypropionsäure (273). β -Brom-D-Alanin (1680 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO_2 (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 1060 mg (62%) **273** als bräunlichen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.2$ ($c = 0.66$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3251, 3041, 2975, 2927, 2856, 1737, 1417, 1338, 1275, 1238, 1172, 1104, 1003, 976.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 3.76 (d, $J = 7.07$ Hz, 2H), 4.29 (t, $J = 4.50$ Hz, 1H), 5.69 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 36.2, 69.8, 172.5.
MS (EI)	m/z 150 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}^+$), 125, 107, 101, 71, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_3\text{H}_3\text{BrO}_2$ ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}^+$) 149.9316; gef. 149.9312.

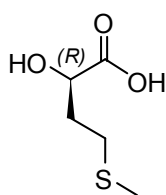
3-(Benzylthio)-(R)-2-hydroxy-propionsäure (274). D-Cystein(Bzl)-OH (1000 mg, 4.7 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (9.5 mmol, 19.0 ml), NaNO_2 (1958 mg, 28.4 mmol) in 6.4 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 572 mg (57%) **274** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3.3$ ($c = 0.70$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3170, 3085, 3061, 3029, 2963, 2924, 1719, 1602, 1558, 1494, 1453, 1417, 1376, 1242, 1179, 1072, 1028, 702.

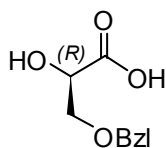
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.58 (dd, J = 13.57, 6.85 Hz, 1H), 2.69 (dd, J = 13.60, 6.92 Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 4.12 (dd, J = 6.85, 4.84 Hz, 1H), 7.23 – 7.34 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 34.8, 35.2, 70.3, 126.8, 128.4, 128.9, 138.3, 174.1.
MS (EI)	m/z 212 (M^+), 194, 181, 165, 137, 123, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{10}H_{12}SO_3$ (M^+) 212.0507; gef. 212.0502.

(R)-2-Hydroxy-4-(methylthio)-buttersäure (275). D-Methionin (1492 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), $NaNO_2$ (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 886 mg (59%) **275** als gelblichen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +26.3$ (c = 0.86, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3324, 2969, 2919, 2848, 1722, 1429, 1366, 1265, 1221, 1171, 1092.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.69 – 1.78 (m, 1H), 1.82 – 1.91 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 2.04 – 2.05 (m, 1H), 2.50 – 2.53 (m, 2H), 4.02 (dd, J = 8.53, 3.96 Hz, 1H), 5.52 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 14.6, 29.3, 33.6, 68.4, 175.6.
MS (EI)	m/z 150 (M^+), 132, 120, 114, 105, 89, 75, 61, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_5H_{10}SO_3$ (M^+) 150.0350; gef. 150.0350.

3-(Benzyloxy)-(R)-2-hydroxy-propionsäure (276). D-Serin(OBzl)-OH (2093 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), $NaNO_2$ (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 1934 mg (92%) **276** als weißen Feststoff.

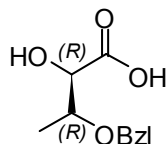


Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -8.3$ (c = 0.72, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3380, 3089, 3064, 3032, 2924, 2870, 1734, 1496, 1454, 1363, 1235, 1209, 1123, 1041, 1028, 741, 698.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.60 (d, J = 4.43 Hz, 2H), 4.15 (t, J = 4.37 Hz, 1H), 4.49 – 4.54 (m, 2H), 5.33 (br s, 1H), 7.25 – 7.35 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 70.0, 72.0, 72.3, 127.4, 127.5, 128.2, 138.3, 173.8.

MS (EI) m/z 196 (M^+), 194, 166, 148, 135, 121, 107, 91, 79, 65, 51.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{10}H_{12}O_4$ (M^+) 196.0735; gef. 196.0733.

3-Benzoyloxy-(R)-2-hydroxy-buttersäure (277). D-Threonin(OBzl)-OH (676 mg, 3.2 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (6.5 mmol, 13.0 ml), $NaNO_2$ (1337 mg, 19.4 mmol) in 4.4 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 625 mg (92%) **277** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +1.1$ ($c = 1.25$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3377, 3089, 3064, 3031, 2978, 2934, 2875, 1955, 1882, 1728, 1648, 1497, 1455, 1377, 1343, 1270, 1208, 1147, 1074, 1027, 1014, 741, 698.

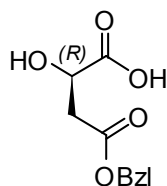
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.15 (d, $J = 6.31$ Hz, 3H), 3.80 – 3.86 (m, 1H), 3.94 (d, $J = 3.49$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 11.95$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 11.95$ Hz, 1H), 5.04 br (s, 1H), 7.24 – 7.33 (m, 5H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 15.5, 70.3, 73.3, 75.8, 127.2, 127.4, 128.1, 138.8, 174.1.

MS (EI) m/z 210 (M^+), 174, 166, 148, 135, 122, 107, 91, 79, 65, 57, 51.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{11}H_{14}O_4$ (M^+) 210.0892; gef. 210.0891.

4-(Benzoyloxy)-(R)-2-hydroxy-4-oxo-buttersäure (278). D-Aspartat(OBzl)-OH (2233 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), $NaNO_2$ (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 1995 mg (89%) **278** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +6.9$ ($c = 1.2$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3380, 3091, 3066, 3035, 2954, 2899, 1736, 1653, 1498, 1456, 1387, 1356, 1269, 1215, 1172, 1103, 751, 699.

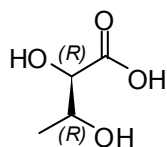
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 2.60 (dd, $J = 15.58, 7.93$ Hz, 1H), 2.76 (dd, $J = 15.58, 7.93$ Hz, 1H), 4.31 (dd, $J = 7.79, 4.84$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.57 (br s, 1H), 7.30 – 7.38 (m, 5H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 38.9, 65.6, 66.9, 127.8, 127.9, 128.4, 136.1, 170.2, 174.3.

MS (EI) m/z 224 (M^+), 196, 179, 167, 150, 121, 108, 91, 79, 65, 51.

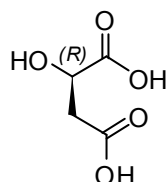
HRMS (EI) m/z ber. für $C_{11}H_{12}O_5$ (M^+) 224.0684; gef. 224.0683.

3-Benzoyloxy-(R)-2-hydroxy-buttersäure (279). Zu einer gut gerührten Lösung von Methanol (36.0 ml) und 2-Hydroxysäure **277** (210 mg, 1.0 mmol), wird unter Schutzgasstrom (Argon) Pd/C 10% (810 mg) zugegeben. Nachdem die Apparatur mit H₂ gesättigt wurde wird die Suspension für 4 h bei Raumtemperatur gerührt, und danach gefiltert (Rotalibo®-syringe Filter, PTFE, 0.45 µm). Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt, und man erhält 115 mg (96%) **279** als weißen Feststoff.



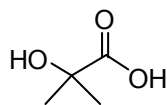
¹H-NMR	δ _H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.39 (dd, <i>J</i> = 6.31 Hz, 3H), 4.01 (m, 1H), 4.18 (dd, <i>J</i> = 7.21 Hz, 1H), 6.53 br (s, 1H),
¹³C-NMR	δ _C (100 MHz; DMSO-d ₆) 20.4, 69.0, 74.2, 176.1.
HRMS (EI)	<i>m/z</i> ber. für C ₄ H ₈ O ₄ (M) ⁺ 120.0423; gef. 120.0431.

4-(Benzoyloxy)-(R)-2-hydroxy-4-oxo-buttersäure (280). Zu einer gut gerührten Lösung von Methanol (36.0 ml) und 2-Hydroxysäure **278** (224 mg, 1.0 mmol), wird unter Schutzgasstrom (Argon) Pd/C 10% (810 mg) zugegeben. Nachdem die Apparatur mit H₂ gesättigt wurde wird die Suspension für 4 h bei Raumtemperatur gerührt, und danach gefiltert (Rotalibo®-syringe Filter, PTFE, 0.45 µm). Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt, und man erhält 123 mg (92%) **379** als weißen Feststoff.



¹H-NMR	δ _H (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.10 (dd, <i>J</i> = 15.71, 7.90 Hz, 1H), 3.92 (dd, <i>J</i> = 15.71, 7.90 Hz, 1H), 4.91 (dd, <i>J</i> = 7.79, 4.84 Hz, 1H), 9.36 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ _C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.1, 67.8, 173.8, 176.1.
HRMS (EI)	<i>m/z</i> ber. für C ₄ H ₆ O ₅ (M) ⁺ 134.0215; gef. 134.0219.

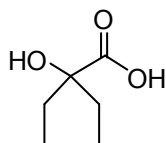
2-Hydroxy-2-methyl-propionsäure (281). 2-Amino-isobuttersäure (1031 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO₂ (4139 mg, 60.0 mmol in 13.5 ml dest. H₂O). Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 583 mg (56%) **281** als weißen Feststoff.



IR	ν _{max} (cm ⁻¹) 3426, 2979, 2936, 2896, 2840, 2761, 2671, 1724, 1277, 1189, 1166, 1144, 976, 764.
¹H-NMR	δ _H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.25 (s, 6H), 5.02 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ _C (100 MHz; DMSO-d ₆) 27.4, 70.7, 177.9.
MS (EI)	<i>m/z</i> 104 (M) ⁺ , 89, 69, 59.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_4H_8O_3$ (M^+)⁺ 104.0473; gef. 104.0472.

2-Ethyl-2-hydroxy-buttersäure (282). 2-Amino-2-ethyl-buttersäure (570 mg, 4.3 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (8.6 mmol, 18.0 ml), $NaNO_2$ (1788 mg, 25.9 mmol) in 5.9 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 245 mg (43%) **282** als weißen Feststoff.



IR ν_{max} (cm^{-1}) 3449, 2971, 2939, 2883, 1718, 1460, 1381, 1360, 1238, 1214, 1128, 1081, 1059, 991.

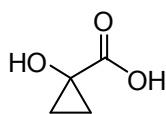
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.78 (t, J = 7.39 Hz, 6H), 1.43 – 1.52 (m, 2H), 1.57 – 1.66 (m, 2H), 4.56 (br s, 1H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 8.0, 31.5, 76.9, 177.0.

MS (EI) m/z 132 (M^+)⁺, 109, 87, 69, 57, 45, 41.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_6H_{12}O_3$ (M^+)⁺ 132.0786; gef. 132.0786.

1-Hydroxy-cyclopropansäure (283). 1-Amino-cyclopropansäure (250 mg, 2.5 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (5.0 mmol, 10.0 ml), $NaNO_2$ (1027 mg, 14.9 mmol) in 3.4 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 137 mg (54%) **283** als weißen Feststoff.



IR ν_{max} (cm^{-1}) 3277, 3177, 3094, 2958, 2924, 2873, 1724, 1633, 1567, 1428, 1291, 1195, 1095, 1067, 1026.

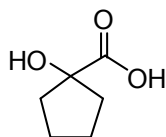
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.87 – 0.90 (m, 2H), 1.05 – 1.08 (m, 2H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 16.6, 52.5, 176.3.

MS (EI) m/z 103 ($M+H$)⁺, 85, 57, 45, 39.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_4H_7O_3$ ($M+H$)⁺ 103.0395; gef. 103.0402.

1-Hydroxy-cyclopentansäure (284). 1-Amino-cyclopentansäure (1000 mg, 7.8 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (15.5 mmol, 31.0 ml), $NaNO_2$ (3208 mg, 46.5 mmol) in 10.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 635 mg (63%) **284** als weißen Feststoff.



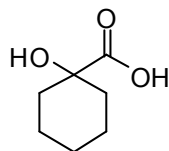
IR ν_{max} (cm^{-1}) 3277, 3177, 3094, 2958, 2924, 2873, 2856, 1724, 1712, 1633, 1567, 1428, 1417, 1291, 1195, 1095, 1067, 1026.

1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.58 – 1.75 (m, 2H), 1.83 – 1.95 (m, 2H), 2.40 – 2.46 (m, 2H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 22.8, 24.2, 31.0, 33.1, 80.7, 177.9.

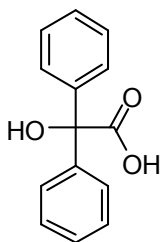
MS (EI)	m/z 130 (M^+), 123, 108, 91, 85, 73, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_6H_{10}O_3$ (M^+) 130.0630; gef. 130.0633.

1-Hydroxy-cyclohexansäure (285). 1-Amino-cyclohexansäure (1000 mg, 7.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (14.0 mmol, 28.0 ml), $NaNO_2$ (2898 mg, 42.0 mmol in 9.5 ml dest. H_2O). Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 595 mg (59%) **285** als weißen Feststoff.



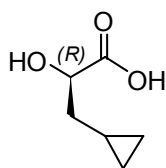
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3160, 2935, 2860, 2654, 1708, 1573, 1451, 1423, 1276, 1252, 1156, 1058, 1038, 992.
1H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.21 – 1.65 (m, 10H).
^{13}C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 21.1, 21.7, 25.0, 30.7, 34.1, 72.2, 177.7.
MS (EI)	m/z 126 ($M-H_2O$) ⁺ , 108, 99, 81, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_7H_{10}O_2$ ($M-H_2O$) ⁺ 126.0681; gef. 126.0681.

Hydroxy-diphenyl-essigsäure (286). 2-Amino-3,3-diphenylpropionsäure (1000 mg, 4.4 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (8.8 mmol, 17.6 ml), $NaNO_2$ (1821 mg, 26.4 mmol) in 5.9 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 392 mg (39%) **286** als weißen Feststoff.



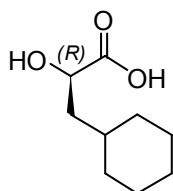
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3450, 3079, 3056, 3031, 2953, 2925, 1947, 1915, 1880, 1723, 1600, 1582, 1564, 1521, 1487, 1451, 1432, 1407, 1346, 1300, 1242, 1188, 1120, 1089, 1078, 757.
1H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 6.33 (s, 1H), 7.16 – 7.22 (m, 2H), 7.26 – 7.37 (m, 8H).
^{13}C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 80.3, 127.1, 127.3, 127.7, 143.7, 174.7.
MS (EI)	m/z 211 ($M-H_2O$) ⁺ , 194, 183, 165, 152, 133, 105, 71, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{14}H_{11}O_2$ ($M-H_2O$) ⁺ 211.0759; gef. 211.0755.

3-Cyclopropyl-(R)-2-hydroxy-propionsäure (287). 3-Cyclopropyl-D-alanin (969 mg, 7.5 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (15.0 mmol, 31.0 ml), $NaNO_2$ (3105 mg, 45.0 mmol in 10.2 ml dest. H_2O). Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 800 mg (82%) **287** als weißen Feststoff.



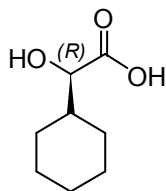
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.8$ ($c = 1.25$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3324, 3081, 3004, 2942, 2920, 2063, 1721, 1649, 1429, 1365, 1233, 1217, 1148, 1085, 1052, 1020, 939, 824.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.02 – 0.10 (m, 2H), 0.32 – 0.43 (m, 2H), 0.76 – 0.86 (m, 1H), 1.37 – 1.44 (m, 1H), 1.48 – 1.55 (m, 1H), 3.96 (dd, $J = 7.46, 4.77$ Hz, 1H), 5.12 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 3.9, 4.6, 7.3, 37.0, 70.2, 175.8.
MS (EI)	m/z 130 (M^+), 112, 97, 84, 76, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$ (M^+) 130.0629; gef. 130.0621.

3-Cyclohexyl-(*R*)-2-hydroxy-propionsäure (288). 3-Cyclohexyl-D-alanin (1460 mg, 8.5 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (17.1 mmol, 34.2 ml), NaNO_2 (3531 mg, 51.2 mmol) in 11.6 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 925 mg (63%) **288** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9.6$ ($c = 1.6$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3304, 2923, 2852, 1723, 1649, 1449, 1276, 1245, 1222, 1203, 1141, 1095, 1077.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.02 – 0.10 (m, 2H), 0.32 – 0.43 (m, 2H), 0.76 – 0.86 (m, 1H), 0.77 – 0.94 (m, 2H), 1.05 – 1.23 (m, 3H), 1.36 – 1.45 (m, 3H), 1.50 – 1.65 (m, 5H), 1.69 – 1.75 (m, 1H), 3.96 (dd, $J = 7.77, 4.37$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 25.6, 25.8, 26.8, 28.9, 41.2, 74.2, 175.3.
MS (EI)	m/z 172 (M^+), 154, 127, 109, 97, 83, 76, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_3$ (M^+) 172.1099; gef. 172.1102.

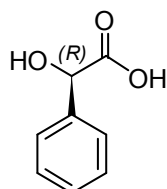
Cyclohexyl-(*R*)-2-hydroxy-essigsäure (289). Cyclohexyl-D-glycin (811 mg, 5.2 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (10.3 mmol, 21.0 ml), NaNO_2 (2136 mg, 30.9 mmol) in 7.0 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 506 mg (62%) **289** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.2$ ($c = 0.90$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3441, 2929, 2854, 1716, 1648, 1451, 1279, 1262, 1256, 1227, 1177, 1111, 1085, 1075.

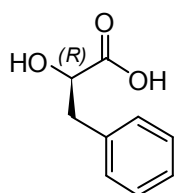
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.99 – 1.24 (m, 5H), 1.50 – 1.60 (m, 4H), 1.66 – 1.68 (m, 2H), 3.72 (d, J = 4.43 Hz, 1H), 4.95 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 25.5, 25.8, 26.7, 28.8, 41.1, 74.1, 175.2.
MS (EI)	m/z 158 (M^+), 140, 113, 95, 83, 76, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3$ (M^+) 158.0942; gef. 158.0944.

(R)-Hydroxy-phenyl-essigsäure (290). D-Phenylglycin (1512 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO_2 (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 1384 mg (91%) **290** als weißen Feststoff.



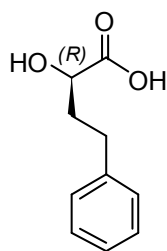
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10.9$ (c = 0.50, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3449, 3089, 3065, 3035, 2931, 1727, 1603, 1496, 1455, 1286, 1243, 1190, 1094, 1065, 936, 724, 693.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 5.01 (s, 1H), 5.83 (br s, 1H), 7.25 – 7.35 (m, 3H), 7.39 – 7.42 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 72.4, 126.6, 127.6, 128.1, 140.2, 174.1.
MS (EI)	m/z 152 (M^+), 135, 122, 107, 90, 79, 77, 63, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ (M^+) 152.0473; gef. 152.0477.

(R)-2-Hydroxy-3-phenyl-propionsäure (291). D-Phenylalanin (1000 mg, 6.1 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (12.1 mmol, 25.0 ml), NaNO_2 (2504 mg, 36.3 mmol) in 8.2 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 885 mg (88%) **30** als weißen Feststoff.



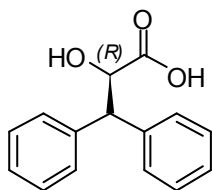
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +7.9$ (c = 1.3, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3411, 3087, 3062, 3030, 2928, 1721, 1604, 1497, 1455, 1366, 1334, 1220, 1186, 1090, 1031, 752, 699.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.77 (dd, J = 13.70, 4.37 Hz, 1H), 2.96 (dd, J = 13.70, 4.57 Hz, 1H), 4.14 (dd, J = 8.33, 4.30 Hz, 1H), 5.28 (br s, 1H), 7.18 – 7.26 (m, 5H), 12.47 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 40.0, 71.0, 126.1, 127.9, 129.4, 138.1, 175.1.
MS (EI)	m/z 166 (M^+), 148, 131, 121, 103, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ (M^+) 166.0629; gef. 166.0628.

(R)-2-Hydroxy-4-phenyl-buttersäure (292). D-Homo-phenylalanin (1000 mg, 5.6 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (11.2 mmol, 25.0 ml), NaNO₂ (2318 mg, 33.6 mmol in 7.6 ml dest. H₂O). Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 616 mg (61%) **31** als weißen Feststoff.



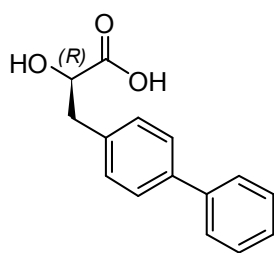
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +5.1$ ($c = 0.90$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3458, 3086, 3062, 3027, 3001, 2957, 2927, 2862, 2870, 2659, 2587, 1732, 1647, 1603, 1454, 1367, 1288, 1270, 1240, 1179, 1096, 1047, 743, 696.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.76 – 1.78 (m, 1H), 1.87 – 1.91 (m, 1H), 2.03 – 2.12 (m, 1H), 2.19 – 2.28 (m, 1H), 3.89 (dd, $J = 8.33, 4.16$ Hz, 1H), 7.16 – 7.21 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 30.9, 35.8, 68.9, 125.8, 128.3, 128.5, 141.6, 175.8.
MS (EI)	m/z 180 (M ⁺) ⁺ , 162, 144, 134, 117, 105, 91, 76, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₀ H ₁₂ O ₃ (M ⁺) ⁺ 180.0786; gef. 180.0784.

(R)-2-Hydroxy-3,3-diphenyl-propionsäure (293). D-2-Amino-3,3-diphenylpropionsäure (1000 mg, 4.2 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (8.4 mmol, 17.0 ml), NaNO₂ (1739 mg, 25.2 mmol) in 5.7 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 417 mg (41%) **293** als weißen Feststoff.



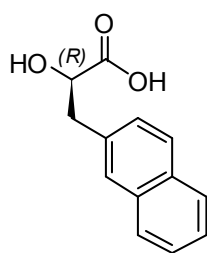
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -10.3$ ($c = 0.11$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3450, 3079, 3056, 3031, 2953, 2925, 1947, 1915, 1880, 1723, 1600, 1582, 1564, 1521, 1487, 1451, 1432, 1407, 1346, 1300, 1242, 1188, 1120, 1089, 1078, 757.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.71 (d, $J = 10.34$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J = 10.34$ Hz, 1H), 7.08 – 7.13 (m, 3H), 7.25 – 7.28 (m, 2H), 7.35 – 7.39 (m, 3H), 7.59 – 7.61 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 60.1, 75.2, 126.5, 127.4, 128.7, 137.0, 142.8, 173.8.
MS (EI)	m/z 243 (M+H) ⁺ , 225, 207, 180, 167, 152, 136, 118, 107, 91, 77, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₅ H ₁₅ O ₃ (M+H) ⁺ 243.1021; gef. 243.1027.

3-(1,1'-Biphenyl)-4-yl)-(R)-2-hydroxy-propionsäure (294). D-2-Amino-3-(1,1'-biphenyl)-4-yl)propionsäure (1000 mg, 4.2 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (8.3 mmol, 17.0 ml), NaNO₂ (1718 mg, 24.9 mmol) in 5.6 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 432 mg (43%) **294** als weißen Feststoff.



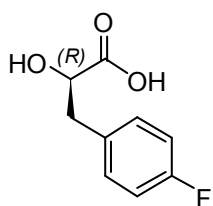
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +14.2$ ($c = 0.90$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3418, 3079, 3059, 3030, 2975, 2928, 1709, 1599, 1586, 1578, 1558, 1496, 1452, 1276, 1217, 1200, 1180, 1072, 1032, 763, 759, 691.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.81 (dd, $J = 13.77, 4.50$ Hz, 1H), 3.04 (dd, $J = 13.77, 4.50$ Hz, 1H), 4.18 (dd, $J = 8.26, 4.50$ Hz, 1H), 5.33 (br s, 1H), 7.31 – 7.35 (m, 3H), 7.42 – 7.46 (m, 2H), 7.54 – 7.56 (m, 2H), 7.62 – 7.64 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.6, 71.0, 126.3, 126.5, 127.2, 128.9, 130.0, 137.4, 138.1, 140.1, 175.1.
MS (EI)	m/z 242 (M ⁺), 224, 179, 167, 152, 115, 91, 69.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₅ H ₁₄ O ₃ (M ⁺) ⁺ 242.0942; gef. 242.0943.

(R)-2-Hydroxy-3-(2-naphtyl)-propionsäure (295). D-2-Amino-3-(2-naphtyl)-propionsäure (1000 mg, 4.7 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (9.3 mmol, 18.6 ml), NaNO₂ (1925 mg, 27.9 mmol) in 6.3 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 503 mg (50%) **295** als rötlichen Feststoff.



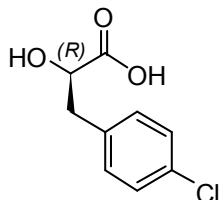
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +9.1$ ($c = 0.55$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3341, 3061, 3048, 3010, 2958, 2935, 1723, 1598, 1511, 1434, 1397, 1356, 1278, 1257, 1212, 1190, 1094, 799, 792, 777.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.15 (dd, $J = 14.57, 8.66$ Hz, 1H), 3.36 (dd, $J = 14.04, 8.66$ Hz, 1H), 4.26 (dd, $J = 8.66, 4.37$ Hz, 1H), 7.39 – 7.53 (m, 4H), 7.90 – 8.11 (m, 3H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 37.3, 70.7, 123.7, 125.4, 125.8, 126.4, 126.9, 127.7, 127.9, 128.6, 128.7, 133.4, 134.2, 175.3.
MS (EI)	m/z 216 (M ⁺), 198, 186, 166, 153, 141, 127, 115, 89, 63.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₃ H ₁₂ O ₃ (M ⁺) ⁺ 216.0786; gef. 216.0786.

3-(4-Fluorphenyl)-(R)-2-hydroxypropionsäure (296). D-4-Fluor-phenylalanin (1000 mg, 5.5 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (11.0 mmol, 25.0 ml), NaNO₂ (2277 mg, 33.0 mmol) in 7.2 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 689 mg (68%) **296** als weißen Feststoff.



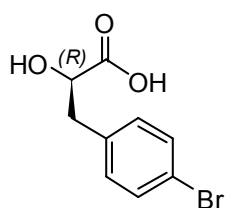
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +14.3$ ($c = 1.05$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3299, 3074, 3046, 3007, 2933, 1725, 1651, 1603, 1510, 1438, 1418, 1356, 1279, 1223, 1159, 1101, 1084, 825.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.77 (dd, $J = 13.70, 4.43$ Hz, 1H), 2.94 (dd, $J = 13.70, 4.43$ Hz, 1H), 4.11 (dd, $J = 8.26, 4.37$ Hz, 1H), 5.29 (br s, 1H), 7.04 – 7.10 (m, 2H), 7.24 – 7.27 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.0, 70.9, 114.5, 114.7, 131.1, 131.2, 134.2, 134.3, 159.7, 162.1, 175.0.
MS (EI)	m/z 184 (M ⁺) ⁺ , 166, 139, 121, 109, 101, 91, 83.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₉ FO ₃ (M ⁺) ⁺ 184.0535; gef. 184.0531.

3-(4-Chlorphenyl)-(R)-2-hydroxypropionsäure (297). D-4-Chlor-phenylalanin (1000 mg, 5.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (10.0 mmol, 20.0 ml), NaNO₂ (2070 mg, 30.0 mmol) in 6.8 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 662 mg (66%) **297** als weißen Feststoff.



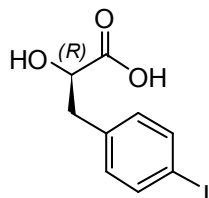
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +5.9$ ($c = 1.02$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3426, 3031, 2971, 2930, 2856, 1725, 1598, 1577, 1492, 1437, 1409, 1369, 1256, 1219, 1180, 1107, 1093, 1016, 813.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.78 (dd, $J = 13.84, 4.30$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 13.83, 4.30$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J = 8.19, 4.43$ Hz, 1H), 7.23 – 7.25 (m, 2H), 7.35 – 7.37 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.2, 70.7, 127.9, 128.2, 131.3, 135.5, 137.1, 174.9.
MS (EI)	m/z 200 (M ⁺) ⁺ , 182, 165, 155, 137, 127, 125, 111, 101, 91, 89, 75.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₉ ClO ₃ (M ⁺) ⁺ 200.0240; gef. 200.0243.

3-(4-Bromphenyl)-(R)-2-hydroxypropionsäure (298). D-4-Brom-phenylalanin (1000 mg, 4.1 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (8.2 mmol, 16.4), NaNO₂ (1697 mg, 24.6 mmol) in 5.6 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 563 mg (56%) **298** als weißen Feststoff.



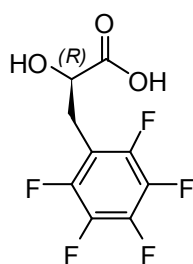
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +7.7$ ($c = 1.55$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3444, 3061, 3028, 2960, 2932, 1724, 1592, 1488, 1437, 1406, 1367, 1235, 1186, 1106, 1072, 1012, 827, 811.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.75 (dd, $J = 13.70, 8.33$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J = 13.70, 4.43$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J = 8.19, 4.43$ Hz, 1H), 5.30 (s, 1H), 7.17 – 7.25 (m, 2H), 7.43 – 7.50 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.2, 70.7, 119.3, 130.8, 131.2, 131.7, 137.6, 174.9.
MS (EI)	m/z 244 (M ⁺) ⁺ , 228, 209, 183, 171, 138, 102, 90, 77, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₉ BrO ₃ (M ⁺) ⁺ 243.9735; gef. 243.9737.

3-(4-Iodphenyl)-(R)-2-hydroxypropionsäure (299). D-4-Iod-phenylalanin (1000 mg, 3.5 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (6.9 mmol, 14.0 ml), NaNO₂ (1424 mg, 20.6 mmol) in 4.7 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 673 mg (51%) **299** als gelblichen Feststoff.



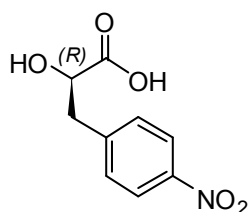
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +5.4$ ($c = 1.3$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3440, 3057, 3022, 2976, 2956, 2928, 1724, 1606, 1588, 1565, 1519, 1485, 1436, 1401, 1346, 1256, 1197, 1187, 1105, 1061, 1007, 823, 808.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.73 (dd, $J = 13.84, 4.43$ Hz, 1H), 2.90 (dd, $J = 13.77, 8.26$ Hz, 1H), 4.11 (dd, $J = 8.19, 4.43$ Hz, 1H), 7.02 – 7.11 (m, 2H), 7.59 – 7.67 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.4, 70.7, 91.9, 131.9, 136.7, 137.0, 174.9.
MS (EI)	m/z 292 (M ⁺) ⁺ , 274, 257, 230, 217, 203, 138, 127, 103, 91, 77, 63, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₉ IO ₃ (M ⁺) ⁺ , 291.9596; gef. 291.9595.

(R)-2-Hydroxy-3-(pentafluorophenyl)-propionsäure (300). D-Penta-fluor-phenylalanin (718 mg, 2.8 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (5.6 mmol, 15.0 ml), NaNO₂ (1165 mg, 16.9 mmol) in 3.8 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 368 mg (51%) **300** als weißen Feststoff.



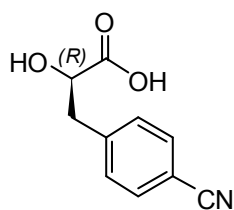
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +11.2$ ($c = 0.67$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3528, 3416, 2954, 2924, 2871, 2854, 1708, 1658, 1447, 1427, 1398, 1370, 1343, 1276, 1235, 1201, 1123, 1093, 1046, 980, 958, 927.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.94 (dd, $J = 13.70, 8.33$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 13.70, 4.43$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J = 8.26, 5.17$ Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 27.5, 67.8, 110.3, 110.4, 110.6, 110.7, 110.9, 111.0, 135.8, 137.0, 137.1, 138.3, 139.7, 142.4, 142.7, 144.9, 145.0, 145.2, 145.3, 174.1.
MS (EI)	m/z 256 (M ⁺), 236, 218, 211, 190, 181, 163, 143, 132, 113, 75, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₅ F ₅ O ₃ (M ⁺) 256.0158; gef. 256.0153.

(R)-2-Hydroxy-3-(4-nitro-phenyl)-propionsäure (301). D-4-Nitro-phenylalanin (1000 mg, 4.8 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (9.5 mmol, 19.0 ml), NaNO₂ (1970 mg, 28.6 mmol) in 6.5 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 450 mg (45%) **301** als weißen Feststoff.



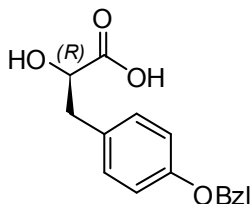
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +16.8$ ($c = 0.97$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3452, 3112, 3080, 2977, 2942, 2856, 1727, 1606, 1518, 1494, 1437, 1347, 1264, 1183, 1109, 1089, 859.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.93 (dd, $J = 13.77, 8.40$ Hz, 1H), 3.09 (dd, $J = 13.70, 4.30$ Hz, 1H), 4.22 (dd, $J = 8.40, 4.23$ Hz, 1H), 5.44 (br s, 1H), 7.52 (d, $J = 8.73$, 1H), 7.60 (d, $J = 8.60$, 1H), 8.12 – 8.18 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.6, 70.3, 123.0, 130.7, 146.2, 146.6, 174.7.
MS (EI)	m/z 211 (M ⁺), 194, 176, 166, 147, 136, 120, 106, 91, 78, 63, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₉ NO ₅ (M ⁺) 211.0481; gef. 211.0491.

3-(4-Cyano-phenyl)-(R)-2-hydroxypropionsäure (302). D-4-Cyano-phenylalanin (1000 mg, 5.3 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (10.5 mmol, 21.0 ml), NaNO₂ (2173 mg, 31.5 mmol) in 7.1 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 542 mg (54%) **302** als weißen Feststoff.



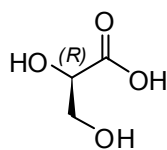
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +17.3$ ($c = 1.56$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3404, 3095, 3071, 2974, 2229, 1726, 1641, 1609, 1544, 1506, 1415, 1262, 1217, 1179, 1114, 1091, 824.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.86 (dd, $J = 13.84, 8.46$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 13.84, 4.30$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 8.40, 4.23$ Hz, 1H), 5.41 (br s, 1H), 7.44 (d, $J = 8.33$, 2H), 7.71 – 7.74 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.8, 70.4, 109.0, 119.0, 130.6, 131.8, 144.3, 174.8.
MS (EI)	m/z 191 (M ⁺) ⁺ , 173, 172, 146, 128, 116, 102, 89, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₀ H ₉ NO ₃ (M ⁺) ⁺ 191.0582; gef. 191.0582.

3-(4-Hydroxy-phenyl)-(R)-2-hydroxy-propionsäure (303). D-Tyrosin(OBzl)-OH (1000 mg, 3.7 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (7.4 mmol, 14.8 ml), NaNO₂ (1523 mg, 22.1 mmol) in 5.0 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 791 mg (79%) **303** als weißen Feststoff.



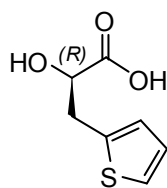
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +13.1$ ($c = 1.05$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3399, 3064, 3034, 3008, 2928, 2872, 1723, 1611, 1584, 1512, 1454, 1382, 1299, 1279, 1242, 1177, 1113, 1026, 828, 736, 696.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.70 (dd, $J = 13.84, 8.06$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J = 13.84, 4.57$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 8.06, 4.57$ Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 5.06 (s, 1H), 6.88 – 6.92 (m, 2H), 7.12 – 7.17 (m, 2H), 7.32 – 7.43 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 40.2, 69.1, 71.2, 114.3, 114.7, 127.6, 127.7, 128.4, 130.2, 130.4, 137.3, 156.8, 175.2.
MS (EI)	m/z 272 (M ⁺) ⁺ , 254, 242, 227, 210, 197, 181, 165, 152, 107, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₁₆ O ₄ (M ⁺) ⁺ 272.1048; gef. 272.1053.

(R)-2,3-Dihydroxy-propionsäure (304). D-Serin (392 mg, 3.7 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (7.4 mmol, 14.8 ml), NaNO₂ (1532 mg, 22.2 mmol) in 5.0 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 238 mg (41%) **304** als weißen Feststoff.



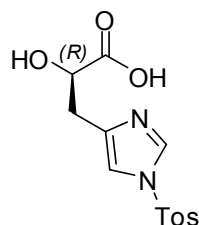
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -6.1$ ($c = 0.95$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3361, 2959, 2935, 1738, 1641, 1455, 1442, 1379, 1210, 1121, 1066, 1007.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.51 (dd, $J = 11.15, 5.24$ Hz, 1H), 3.54 (dd, $J = 11.15, 5.24$ Hz, 1H), 3.94 (dd, $J = 5.04, 4.10$ Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 63.7, 71.9, 174.3.
MS (EI)	m/z 106 (M ⁺), 90, 76, 58, 43, 32.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₃ H ₆ O ₄ (M ⁺) 106.0773; gef. 106.0776.

(R)-2-Hydroxy-3-thien-2-yl-propionsäure (305). D-Thienylalanin (1190 mg, 6.5 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (13.1 mmol, 26.2 ml), NaNO₂ (2707 mg, 39.2 mmol) in 8.8 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 822 mg (73%) **305** als rötlichen Feststoff.



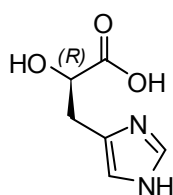
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -13.2$ ($c = 0.84$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3477, 3105, 3072, 2929, 1726, 1650, 1558, 1534, 1437, 1326, 1361, 1342, 1266, 1236, 1194, 1141, 1078, 1070, 848, 830, 701, 694.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.01 (dd, $J = 14.50, 8.66$ Hz, 1H), 3.16 (dd, $J = 14.50, 8.66$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J = 7.66, 4.30$ Hz, 1H), 5.45 (br s, 1H), 6.88 (dd, $J = 3.06, 1.21$ Hz, 1H), 6.92 (dd, $J = 3.08, 1.26$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 5.10, 1.34$ Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 34.3, 70.7, 124.5, 126.1, 126.5, 139.7, 174.6
MS (EI)	m/z 172 (M ⁺), 154, 142, 127, 109, 97, 85, 65, 53.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₇ H ₈ O ₄ S (M ⁺) 172.0194; gef. 172.0194.

(R)-2-Hydroxy-3-{1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1H-imidazol-4-yl}-propionsäure (306). D-Histidin(Tos)-OH (3712 mg, 12.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (24.0 mmol, 48.0 ml), NaNO₂ (4967 mg, 72.0 mmol) in 16.2 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 2492 mg (39%) **306** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +27.3$ ($c = 0.21$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3271, 3148, 3032, 2956, 2923, 2857, 1745, 1626, 1599, 1496, 1439, 1359, 1307, 1209, 1190, 1176, 1124, 1096, 1034, 1009, 933, 816, 769.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.28 (s, 3H), 2.88 (dd, $J = 15.18, 8.19$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 15.18, 8.19$ Hz, 1H), 4.26 (dd, $J = 8.13, 4.37$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 7.79$ Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 8.06$ Hz, 2H), 8.97 (d, $J = 1.21$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 20.8, 29.1, 68.7, 116.8, 125.5, 128.2, 129.8, 133.7, 137.9, 145.4, 174.2.
MS (EI)	m/z 311 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 293, 278, 254, 223, 197, 172, 155, 139, 123, 114, 107, 91, 77, 70, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}(\text{M}+\text{H})^+$ 311.0944; gef. 311.0944.

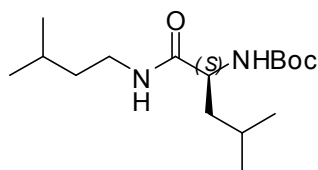
(R)-2-Hydroxy-3-(1H-imidazol-4-yl)-propionsäure (307). **306** (310 mg, 1.0 mmol) wird in



THF (7 ml) bei 0 °C gelöst. Folgend gibt man langsam Phenyldimethylsilyllithium (568 mg, 4.0 mmol) gelöst in THF (3 ml) zu der gut gerührten Reaktionslösung und rührt für weitere 2 h. Anschließend titriert man die Reaktionslösung auf pH 2 und extrahiert mit Ethylacetat 3 mal (30 ml). Man erhält 107 mg (69%) **307** als bräunlichen Feststoff.

IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3271, 3136, 2958, 2925, 1740, 1598, 1521, 1505, 1437, 1423, 1382, 1260, 1221, 1120, 1068, 1050, 857, 864.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.96 (dd, $J = 8.06, 4.33$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 8.06, 4.33$ Hz, 1H), 4.33 (dd, $J = 8.06, 4.57$ Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, $J = 1.48$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 1.53$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 29.2, 68.7, 119.7, 130.5, 135.2, 173.0.
MS (EI)	m/z 156 (M^+) $^+$, 139, 137, 111, 95, 81, 89, 75.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ (M^+) $^+$ 156.0535; gef. 156.0534.

Dipeptid (317). Boc-L-Leucin **312** (9.73 g, 40.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre



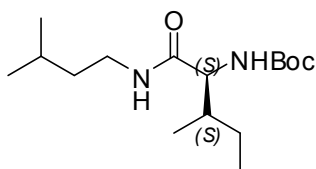
(Argon) in DCM (400.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung langsam Isopentylamin **316** (5.23 g, 60.0 mmol) zu. Nachdem sich eine homogene Reaktionslösung gebildet hat wird in zwei Portionen EDAC (9.19 g, 48.0 mmol)

zugesezt und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) gießt man die Reaktionslösung in Wasser (600.0 ml) und separiert die Phasen.

Folgend wird die organische Phase zuerst mit Wasser (600.0 ml) und danach mit einer 1 M Zitronensäure-Lsg. (600.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 8.52 g (71%) **317** als weißen Feststoff.

DC	$R_f = 0.31$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3311, 3273, 3094, 2962, 2933, 2876, 1683, 1646, 1561, 1528, 1464, 1391, 1366, 1316, 1297, 1248, 1178, 1045, 1020.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.82 (d, $J = 5.10$ Hz, 6H), 0.85 (d, $J = 5.10$ Hz, 6H), 1.20 – 1.32 (m, 5H), 1.36 (s, 9H), 1.38 – 1.41 (m, 1H), 1.51 – 1.58 (m, 2H), 3.00 – 3.07 (m, 2H), 3.85 – 3.91 (m, 1H), 6.76 (d, $J = 8.46$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J = 5.57$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 21.6, 22.4, 24.3, 25.0, 28.2, 36.6, 38.0, 41.0, 52.8, 77.9, 155.2, 172.2.
MS (EI)	m/z 300 (M^+), 281, 244, 227, 186, 170, 142, 130, 116, 86, 71, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$ (M^+) 300.2412; gef. 300.2394.

Dipeptid (318). Boc-L-Isoleucin **313** (9.73 g, 40.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre (Argon) in DCM (400.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung langsam Isopentylamin **316** (5.23 g, 60.0 mmol) zu. Nachdem sich eine homogene Reaktionslösung gebildet hat wird in zwei Portionen EDAC (9.19 g, 48.0 mmol) zugesetzt und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) gießt man die Reaktionslösung in Wasser (600.0 ml) und separiert die Phasen. Folgend wird die organische Phase zuerst mit Wasser (600.0 ml) und danach mit einer 1 M Zitronensäure-Lsg. (600.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 7.80 g (65%) **318** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.32$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3311, 3271, 3094, 2963, 2934, 2876, 1683, 1647, 1561, 1528, 1464, 1391, 1366, 1316, 1297, 1248, 1178, 1045, 1020.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.77 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.79 (t, $J = 5.58$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 5.10$ Hz, 6H), 1.00 – 1.08 (m, 1H), 1.26 (q, $J = 6.90$

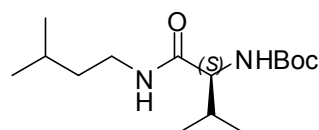
Hz, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.39 – 1.67 (m, 5H), 2.99 – 3.09 (m, 2H), 3.71 (t, $J = 8.46$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 8.87$ Hz, 1H), 7.77 (t, $J = 5.37$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 11.0, 15.4, 22.3, 24.4, 25.0, 28.2, 36.4, 36.6, 38.0, 58.8, 77.9, 155.3, 171.1.

MS (EI) m/z 300 (M^+), 292, 247, 238, 228, 193, 186, 165, 152, 130, 86, 71, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$ (M^+) 300.2412; gef. 300.2404.

Dipeptid (319). Boc-L-Valin **314** (8.69 g, 40.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre (Argon) in DCM (400.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung langsam Isopentylamin **316** (5.23 g, 60.0 mmol) zu. Nachdem sich eine homogene Reaktionslösung gebildet hat wird in zwei Portionen EDAC (9.2 g, 48.0 mmol) zugesetzt und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) gießt man die Reaktionslösung in Wasser (600.0 ml) und separiert die Phasen. Folgend wird die organische Phase zuerst mit Wasser (600.0 ml) und danach mit einer 1 M Zitronensäure-Lsg. (600.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (n -Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 6.98 g (61%) **319** als weißen Feststoff.



DC $R_f = 0.26$ (n -Hexan/EtOAc = 2:1).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3318, 3279, 3098, 2961, 2932, 2872, 1684, 1647, 1567, 1526, 1470, 1455, 1391, 1366, 1301, 1249, 1177, 1043, 1018.

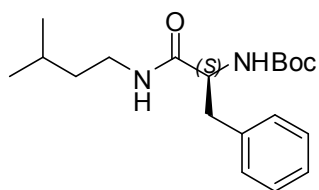
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.80 (dd, $J = 6.45, 4.33$ Hz, 6H), 0.84 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.27 (q, $J = 6.98$ Hz, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.52 – 1.59 (m, 1H), 1.84 – 1.90 (m, 1H), 3.00 – 3.09 (m, 2H), 3.66 – 3.70 (m, 1H), 6.55 (d, $J = 9.13$ Hz, 1H), 7.75 (t, $J = 5.24$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 18.2, 19.2, 22.3, 25.0, 28.2, 30.3, 36.6, 38.0, 59.8, 77.9, 155.4, 171.0.

MS (EI) m/z 286 (M^+), 244, 213, 188, 172, 143, 116, 98, 72, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ (M^+) 286.2256; gef. 286.2245.

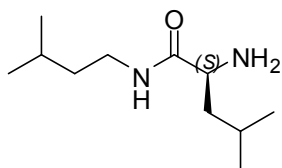
Dipeptid (320). Boc-L-Phenylalanin **315** (10.61 g, 40.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre (Argon) in DCM (400.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung langsam Isopentylamin **316** (5.23 g, 60.0 mmol) zu. Nachdem sich eine homogene Reaktionslösung gebildet hat wird in zwei Portionen EDAC



(9.19 g, 48.0 mmol) zugesetzt und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) gießt man die Reaktionslösung in Wasser (600.0 ml) und separiert die Phasen. Folgend wird die organische Phase zuerst mit Wasser (600.0 ml) und danach mit einer 1 M Zitronensäure-Lsg. (600.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 10.55 g (79%) **320** als weißen Feststoff.

DC	$R_f = 0.29$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3300, 3085, 3063, 3028, 2956, 2930, 2870, 1656, 1604, 1526, 1496, 1469, 1454, 1438, 1367, 1337, 1309, 1236, 1201, 1172, 1131, 1031, 700.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.83 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.23 (q, $J = 6.98$ Hz, 2H), 1.29 (s, 9H), 1.45 – 1.54 (m, 1H), 2.68 – 2.90 (m, 2H), 2.98 – 3.10 (m, 2H), 4.05 – 4.11 (m, 1H), 6.84 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 7.15 – 7.26 (m, 5H), 7.77 (t, $J = 5.37$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 22.4, 24.9, 28.1, 36.6, 37.7, 38.0, 55.8, 77.9, 126.1, 128.0, 129.2, 138.2, 155.2, 171.2.
MS (EI)	m/z 334 (M^+), 278, 261, 237, 220, 193, 176, 164, 143, 120, 103, 91, 77, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ (M^+) ⁺ 334.2256; gef. 334.2249.

Dipeptid (321). Dipeptid **317** (6.0 g, 20.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre (Argon) in DCM (24.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung langsam TFA (22.1 ml, 260.0 mmol) zu und rührt für 1 h. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) titriert man die Reaktionslösung mit ges. NaCO_3 -Lsg. auf pH 9 und rührt für weitere 20 min.



Folgend trennt man die Phasen und extrahiert die wässrige Phase zweimal mit DCM (200.0 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (Chloroform/Methanol = 9:1). Man erhält 3.92 g (98%) **321** als gelbliches Öl.

IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3287, 3090, 2961, 2937, 2874, 1665, 1572, 1470, 1434, 1389, 1370, 1202, 1183, 1141, 722.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.83 (d, $J = 6.58$ Hz, 6H), 0.86 (d, $J = 6.58$ Hz, 6H), 1.20 – 1.25 (m, 1H), 1.28 (q, $J = 6.98$ Hz, 2H), 1.35 – 1.41 (m,

^1H), 1.50 – 1.69 (m, 2H), 2.99 – 3.13 (m, 2H), 3.19 (dd, $J = 8.53, 5.84$ Hz, 1H), 3.37 (br s, 2H), 7.91 (t, $J = 5.51$ Hz, 1H).

 ^{13}C -NMR

δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 22.0, 22.3, 22.4, 23.0, 24.1, 25.1, 36.5, 38.1, 43.7, 52.7, 174.1.

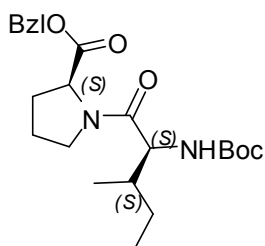
MS (EI)

m/z 201 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 185, 177, 168, 158, 143, 115, 86, 69, 51.

HRMS (EI)

m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_1$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 201.1966; gef. 201.1959.

Dipeptid (322). L-Prolin(Bzl)-OH **311** (8.2 g, 40.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre



(Argon) in DCM (800.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung HOBt (4.59 g, 34.0 mmol) gefolgt von Boc-L-Isoleucin **313** (13.86 g, 60.0 mmol) zu und rührt für weitere 10 min. Nachdem sich eine homogene Reaktionslösung gebildet hat wird in zwei Portionen EDAC (11.46 g, 60.0 mmol) zugesetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-

Kontrolle) wird die Reaktionslösung zuerst zweimal mit ges. NaCO_3 -Lsg. (100.0 ml) und folgend mit Wasser (100.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (n -Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 12.88 g (77%) **322** als weißen Feststoff.

DC

$R_f = 0.28$ (n -Hexan/EtOAc = 3:1).

IR

ν_{max} (cm^{-1}) 3322, 3064, 3033, 2968, 2934, 2876, 2817, 2769, 1746, 1706, 1643, 1560, 1520, 1499, 1455, 1436, 1390, 1366, 1275, 1251, 1168, 1096, 1042, 1017, 699.

 ^1H -NMR

δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.76 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H), 0.81 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.00 – 1.18 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.43 – 1.50 (m, 1H), 1.65 – 1.71 (m, 1H), 1.79 – 1.93 (m, 3H), 2.14 – 2.23 (m, 1H), 3.55 – 3.78 (m, 2H), 3.99 – 4.05 (m, 1H), 4.37 (dd, $J = 8.46, 5.24$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 3.49$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 7.30 – 7.38 (m, 5H).

 ^{13}C -NMR

δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.6, 14.7, 24.2, 24.6, 28.2, 28.7, 35.9, 46.9, 55.9, 58.6, 65.8, 78.0, 127.8, 128.0, 128.4, 136.0, 155.5, 170.7, 171.7.

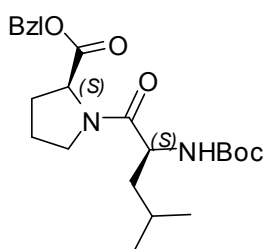
MS (EI)

m/z 418 (M^+) $^+$, 362, 345, 306, 261, 234, 204, 186, 158, 130, 108, 91, 86, 70, 57.

HRMS (EI)

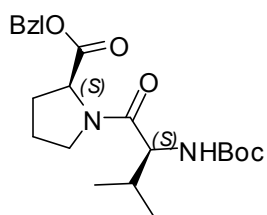
m/z ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5$ (M^+) $^+$ 418.2467; gef. 418.2468.

Dipeptid (323). L-Prolin(Bzl)-OH **311** (2.05 g, 10.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre (Argon) in DCM (200.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung HOBt (1.15 g, 8.5 mmol) gefolgt von Boc-L-Leucin **312** (3.47 g, 15.0 mmol) zu und rührt für weitere 10 min. Nachdem sich eine homogene Reaktionslösung gebildet hat wird in zwei Portionen EDAC (2.87 g, 15.0 mmol) zugesetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung zuerst zweimal mit ges. NaCO₃-Lsg. (25.0 ml) und folgend mit Wasser (25.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 2.99 g (72%) **323** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.33$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3322, 3064, 3033, 2969, 2935, 2876, 2817, 2770, 1746, 1706, 1643, 1561, 1521, 1499, 1455, 1436, 1390, 1382, 1366, 1314, 1275, 1251, 1169, 1095, 1043, 1017, 699.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.82 (dd, $J = 9.27, 6.58$ Hz, 6H), 1.35 (s, 9H), 1.58 – 1.74 (m, 4H), 1.84 – 2.02 (m, 3H), 3.70 (dd, $J = 8.46, 5.51$ Hz, 2H), 4.16 – 4.29 (m, 1H), 4.38 (dd, $J = 8.60, 4.84$ Hz, 1H), 5.03 – 5.23 (m, 2H), 5.76 (d, $J = 5.91$ Hz, 1H), 7.29 – 7.41 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 24.1, 24.7, 25.2, 28.2, 28.5, 37.6, 45.1, 46.5, 59.1, 65.5, 77.9, 127.8, 127.9, 128.0, 128.4, 128.5, 135.9, 158.0, 171.2, 171.7.
MS (EI)	m/z 418 (M ⁺), 362, 345, 319, 306, 261, 234, 204, 186, 173, 130, 114, 91, 86, 70, 58.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₃ H ₃₄ N ₂ O ₅ (M ⁺) ⁺ 418.2467; gef. 418.2462.

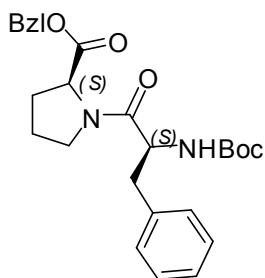
Dipeptid (324). L-Prolin(Bzl)-OH **311** (2.05 g, 10.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre (Argon) in DCM (200.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung HOBt (1.15 g, 8.5 mmol) gefolgt von Boc-L-Valin **314** (3.26 g, 15.0 mmol) zu und rührt für weitere 10 min. Nachdem sich eine homogene Reaktionslösung gebildet hat wird in zwei Portionen EDAC (2.87 g, 15.0 mmol) zugesetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung zuerst zweimal mit ges. NaCO₃-Lsg. (25.0 ml) und folgend mit Wasser (25.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das



Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 2.46 g (61%) **324** als weißen Feststoff.

DC	$R_f = 0.36$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3322, 3066, 3033, 2972, 2934, 2876, 2818, 2770, 1745, 1708, 1649, 1554, 1499, 1434, 1391, 1366, 1314, 1277, 1248, 1169, 1095, 1042, 1016, 699.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.83 (dd, $J = 11.15, 6.58$ Hz, 6H), 1.35 (s, 9H), 1.44 – 1.51 (m, 1H), 1.57 – 1.75 (m, 2H), 1.79 – 1.92 (m, 2H), 3.68 – 3.77 (m, 2H), 3.97 – 4.04 (m, 1H), 4.37 (dd, $J = 8.60, 5.10$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 6.85 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 7.30 – 7.37 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 18.3, 18.8, 24.7, 28.2, 28.7, 29.8, 46.4, 57.1, 59.1, 65.6, 78.0, 127.8, 127.9, 128.0, 128.4, 128.5, 135.9, 155.6, 170.6, 171.7.
MS (EI)	m/z 404 (M ⁺), 348, 331, 305, 287, 261, 234, 213, 204, 172, 144, 116, 91, 72, 70.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₅ (M ⁺) ⁺ 404.2311; gef. 404.2294.

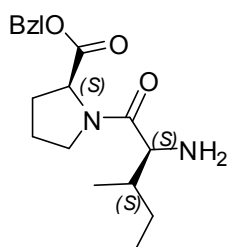
Dipeptid (325). L-Prolin(Bzl)-OH **311** (2.05 g, 10.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre (Argon) in DCM (200.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung HOBt (1.15 g, 8.5 mmol) gefolgt von Boc-L-Phenylalanin **315** (3.98 g, 15.0 mmol) zu und rührt für weitere 10 min. Nachdem sich eine homogene Reaktionslösung gebildet hat wird in zwei Portionen EDAC (2.87 g, 15.0 mmol) zugesetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung zuerst zweimal mit ges. NaCO₃-Lsg. (25.0 ml) und folgend mit Wasser (25.0 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 3.12 g (69%) **325** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.31$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3321, 3086, 3062, 3029, 2974, 2947, 2876, 2817, 2774, 1743, 1708, 1649, 1558, 1522, 1497, 1453, 1442, 1391, 1366, 1272, 1250, 1167, 1096, 1081, 1044, 1023, 745, 700.

$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.28 (s, 9H), 1.43 – 1.50 (m, 2H), 1.58 – 1.76 (m, 2H), 3.70 (dd, J = 8.46, 5.51 Hz, 2H), 4.01 (q, J = 7.25 Hz, 2H), 4.22 – 4.35 (m, 1H), 4.40 (dd, J = 8.73, 4.43 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.80 (d, J = 5.91 Hz, 1H), 7.13 – 7.26 (m, 5H), 7.30 – 7.37 (m, 5H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 25.2, 27.7, 28.6, 37.6, 46.5, 53.8, 59.1, 66.3, 78.0, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 128.5, 129.3, 136.0, 136.2, 155.3, 170.5, 171.7.
MS (EI)	m/z 452 (M^+), 396, 379, 335, 305, 261, 220, 200, 164, 125, 120, 91, 70, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ (M^+) ⁺ 452.2311; gef. 452.2327.

Dipeptid (326). Dipeptid **322** (8.36 g, 20.0 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre (Argon)



in DCM (24.0 ml) gelöst. Danach gibt man der Reaktionslösung zuerst Triisopropylsilan (50.0 mmol) und danach langsam TFA (22.1 ml, 260.0 mmol) zu und rührt für 1 h bei Raumtemperatur. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) titriert man die Reaktionslösung mit ges. NaCO_3 -Lsg. auf pH 9 und rührt für weitere 20 min. Anschließend trennt man die Phasen und extrahiert die wässrige

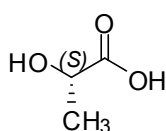
Phase zweimal mit DCM (200.0 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (Chloroform/Methanol = 9:0.5). Man erhält 2.93 g (92%) **326** als weißen Feststoff.

DC	R_f = 0.40 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 9:0.5).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3066, 3034, 2969, 2933, 2881, 2659, 1745, 1674, 1519, 1500, 1455, 1376, 1355, 1276, 1243, 1202, 1176, 1133, 1098, 1029, 1000, 833, 799, 721, 699.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.86 (t, J = 7.32 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.85 Hz, 3H), 1.15 – 1.23 (m, 1H), 1.52 – 1.62 (m, 1H), 1.88 – 1.98 (m, 4H), 2.19 – 2.26 (m, 1H), 3.49 – 3.72 (m, 2H), 4.05 (d, J = 5.51 Hz, 1H), 4.54 (dd, J = 8.53, 5.17 Hz, 1H), 5.06 – 5.17 (m, 2H), 7.28 – 7.36 (m, 5H), 8.19 (br s, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 11.1, 14.3, 23.9, 24.9, 28.9, 36.7, 47.5, 56.0, 59.5, 67.0, 128.2, 128.4, 128.6, 135.4, 167.6, 171.3.
MS (EI)	m/z 318 (M^+), 261, 233, 204, 171, 154, 125, 108, 91, 86, 70, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_1$ (M^+) ⁺ 318.1943; gef. 318.1937.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der α -L-Hydroxysäuren (338 – 360)

Zu einer α -L-Aminosäure (10.0 mmol) in 0.5 M H_2SO_4 (40.0 ml, 20.0 mmol), wird bei 0 °C eine Lösung aus NaNO_2 (60.0 mmol) in H_2O (13.5 ml) sehr langsam zugesetzt. Die Temperatur muss während der Zugabe der NaNO_2 -Lsg. unter 5 °C gehalten werden. Nach erfolgter Zugabe wird die Reaktionslösung für weitere 3 h bei 0 °C gerührt. Anschließend lässt man die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur kommen und rührt für weiter 24 h. Danach wird die Reaktionslösung dreimal mit Diethylether (50.0 ml) extrahiert und mit ges. Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wird abfiltriert und die flüchtigen Komponenten werden unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether).

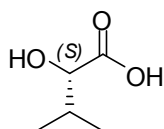
(S)-2-Hydroxypropionsäure (338). L-Alanin (2000 mg, 22.4 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (44.9



mmol, 90.0 ml), NaNO_2 (9289 mg, 134.6 mmol) in 30.3 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 908 mg (45%) **338** als gelbliches Öl.

Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +44.2$ ($c = 0.91$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3206, 2990, 2943, 1729, 1455, 1277, 1203, 1124, 1096, 11043.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 1.22 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 4.03 (q, $J = 6.90$ Hz, 1H), 7.77 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 20.5, 65.8, 176.3.
MS (EI)	m/z 90 (M^+), 74, 58, 46.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (M^+) 90.0316; gef. 90.0316.

(S)-2-Hydroxy-3-methyl-buttersäure (339). L-Valin (588 mg, 5.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (10.0

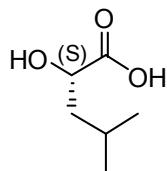


mmol, 20.0 ml), NaNO_2 (2070 mg, 30.0 mmol) in 6.8 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 502 mg (85%) **339** als weißen Feststoff.

Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +17.5$ ($c = 1.0$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3423, 3171, 2967, 2936, 2878, 1720, 1468, 1390, 1371, 1254, 1215, 1178, 1137, 1066, 1028.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.81 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.88 - 1.94 (m, 1H), 3.72 (d, $J = 4.30$ Hz, 1H), 4.98 (br s, 1H), 12.35 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 16.8, 18.9, 31.4, 74.5, 175.4.

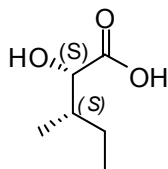
MS (EI)	m/z 119 (M+H) ⁺ , 101, 91, 83, 73, 59, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₅ H ₁₁ O ₃ (M+H) ⁺ 119.0708; gef. 119.0710.

(S) -2-Hydroxy-4-methyl-valeriansäure (340). L-Leucin (1312 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO₂ (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 1123 mg (85%) **340** als weißen Feststoff.



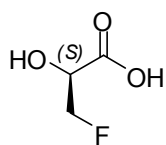
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -25.9$ (c = 1.0, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3186, 2959, 2938, 2872, 1723, 1470, 1456, 1388, 1369, 1266, 1217, 1141, 1086.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 0.96 (d, J = 6.72 Hz, 6H), 1.60 - 1.63 (m, 2H), 1.88 - 1.94 (m, 1H), 4.29 (dd, J = 8.19, 5.24 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; CDCl ₃) 21.4, 23.2, 24.5, 43.2, 68.9, 180.5.
MS (EI)	m/z 132 (M) ⁺ , 113, 99, 87, 76, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₆ H ₁₂ O ₃ (M) ⁺ 132.0786; gef. 132.0790.

(S)-2-Hydroxy-3-methyl-valeriansäure (341). L-Isoleucin (1312 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO₂ (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 898 mg (68%) **341** als weißen Feststoff.



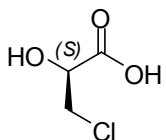
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +21.9$ (c = 1.0, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3314, 2966, 2937, 2879, 1718, 1649, 1463, 1381, 1273, 1242, 1216, 1135, 1071, 1045, 1018.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.82 (t, J = 7.02 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.98 Hz, 3H), 1.08 - 1.19 (m, 2H), 1.34 - 1.45 (m, 1H), 1.61 - 1.70 (m, 1H), 3.76 (d, J = 4.84 Hz, 1H), 5.00 (br s, 1H), 12.31 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 11.5, 15.4, 23.7, 38.1, 74.0, 175.4.
MS (EI)	m/z 133 (M+H) ⁺ , 115, 103, 87, 76, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₆ H ₁₃ O ₃ (M+H) ⁺ 133.0864; gef. 133.0869.

3-Fluor-(S)-2-hydroxy-propionsäure (342). β -Fluor-L-Alanin (1000 mg, 9.2 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (18.4 mmol, 36.8 ml), NaNO_2 (3808 mg, 55.2 mmol) in 12.4 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 746 mg (75%) **342** als gelbliches Öl.



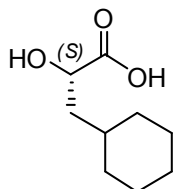
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +5.3$ ($c = 0.18$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3378, 3196, 2966, 2925, 2855, 2619, 2564, 1731, 1561, 1459, 1418, 1379, 1237, 1208, 1122, 1063, 999, 892, 847, 777.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 4.19 (dd, $J = 4.30, 2.96$ Hz, 0.5H), 4.27 (dd, $J = 4.30, 2.96$ Hz, 0.5H), 4.45 – 4.52 (m, 1H), 4.56 – 4.63 (m, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 69.6, 69.8, 84.3, 86.0, 172.4, 172.5.
MS (EI)	m/z 109 ($\text{M}+\text{H}^+$), 109, 92, 72, 63, 46.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_3\text{H}_5\text{FO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 109.0301; gef. 109.0293.

3-Chlor-(S)-2-hydroxy-propionsäure (343). β -Chlor-L-Alanin (1000 mg, 8.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (16.0 mmol, 32.0 ml), NaNO_2 (3311 mg, 48.0 mmol) in 10.8 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 884 mg (69%) **343** als gelblichen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +8.6$ ($c = 0.98$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3361, 3039, 2975, 1981, 1734, 1428, 1368, 1299, 1220, 1186, 1100, 1010, 911, 861, 771, 687, 675.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 3.76 (d, $J = 4.40$ Hz, 2H), 4.29 (d, $J = 4.40$ Hz, 1H), 5.69 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 47.2, 70.1, 172.5.
MS (EI)	m/z 125 ($\text{M}+\text{H}^+$), 108, 92, 81, 79, 75, 63, 49.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 125.0005; gef. 125.0003.

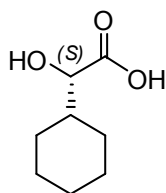
3-Cyclohexyl-(S)-2-hydroxy-propionsäure (344). 3-Cyclohexyl-L-alanin (1000 mg, 5.8 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (11.7 mmol, 23.4 ml), NaNO_2 (2417 mg, 35.0 mmol) in 7.9 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 889 mg (89%) **344** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10.3$ ($c = 0.94$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3345, 2923, 2852, 1723, 1649, 1449, 1277, 1246, 1223, 1202, 1142, 1095, 1077, 1054.

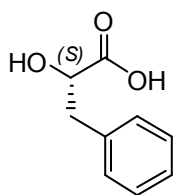
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.77 – 0.92 (m, 2H), 1.08 – 1.15 (m, 2H), 1.38 – 1.44 (m, 3H), 1.60 – 1.66 (m, 5H), 1.72 – 1.75 (m, 1H), 3.95 (dd, J = 7.41, 4.30 Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 25.7, 25.9, 26.1, 31.8, 33.2, 33.5, 41.5, 67.5, 176.4.
MS (EI)	m/z 172 (M^+), 154, 136, 127, 109, 97, 83, 76, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_3$ (M^+) ⁺ 172.1099; gef. 172.1102.

Cyclohexyl-(S)-2-hydroxy-essigsäure (345). Cyclohexyl-L-glycin (1000 mg, 6.3 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (12.7 mmol, 25.4 ml), NaNO_2 (2633 mg, 38.2 mmol) in 8.6 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 767 mg (77%) **345** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +6.5$ (c = 0.84, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3432, 2929, 2852, 1736, 1646, 1451, 1445, 1304, 1280, 1266, 1256, 1227, 1197, 1178, 1109, 1084, 1074.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.99 – 1.24 (m, 5H), 1.50 – 1.60 (m, 4H), 1.66 – 1.69 (m, 1H), 3.71 (d, J = 4.57 Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 25.6, 25.8, 25.9, 26.8, 28.9, 41.2, 74.2, 175.3.
MS (EI)	m/z 159 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 141, 123, 113, 95, 83, 81, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ 159.1021; gef. 159.1033.

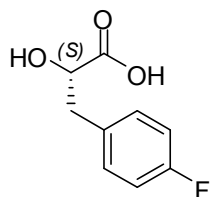
(S)-2-Hydroxy-3-phenyl-propionsäure (346). L-Phenylalanin (1651 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO_2 (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 1578 mg (95%) **346** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -21.3$ (c = 2.0, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3299, 3074, 3046, 3007, 2933, 1725, 1651, 1603, 1510, 1438, 1418, 1365, 1223, 1159, 1101, 825.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.76 (dd, J = 13.70, 8.33 Hz, 1H), 2.95 (dd, J = 13.70, 4.57 Hz, 1H), 4.13 (dd, J = 8.33, 4.30 Hz, 1H), 5.28 (br s, 1H), 7.16 – 7.27 (m, 5H), 12.47 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 40.0, 71.0, 126.1, 127.9, 129.4, 138.1, 175.1.
MS (EI)	m/z 166 (M^+), 148, 136, 121, 103, 91, 77, 65, 51.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_9H_{10}O_3$ (M^+)⁺ 166.0629; gef. 166.0624.

(S)-4-Fluor-2-hydroxy-3-phenyl-propionsäure (347). L-4-Fluor-phenylalanin (1000 mg, 5.4 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (10.8 mmol, 21.6 ml), $NaNO_2$ (2235 mg, 32.4 mmol) in 7.3 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 804 mg (80%) **347** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -14.3$ ($c = 0.95$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3289, 3074, 3045, 2931, 2858, 1724, 1603, 1510, 1439, 1418, 1363, 1223, 1159, 1101, 1084, 1017, 824.

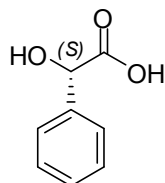
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 2.76 (dd, $J = 13.84, 8.33$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 13.84, 4.43$ Hz, 1H), 4.11 (dd, $J = 8.33, 4.43$ Hz, 1H), 5.30 (br s, 1H), 7.04 – 7.10 (m, 2H), 7.22 – 7.28 (m, 2H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 39.0, 70.9, 114.5, 114.7, 131.1, 131.2, 134.2, 134.3, 162.1, 164.1, 175.0.

MS (EI) m/z 184 (M^+)⁺, 166, 139, 121, 109, 101, 91, 83.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_9H_9FO_3$ (M^+)⁺ 184.0535; gef. 184.0540.

(S)-Hydroxy-phenyl-essigsäure (348). L-Phenylglycine (1512 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H_2SO_4 (20.0 mmol, 40.0 ml), $NaNO_2$ (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H_2O . Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 1444 mg (95%) **348** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +42.5$ ($c = 0.52$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3449, 3089, 3065, 3035, 2931, 1727, 1653, 1496, 1455, 1286, 1243, 1190, 1094, 1065, 936, 724, 693.

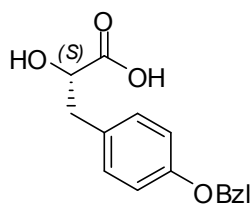
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 5.01 (s, 1H), 5.82 (br s, 1H), 7.25 – 7.30 (m, 1H), 7.31 – 7.35 (m, 2H), 7.39 – 7.42 (m, 2H), 12.60 (br s, 1H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 72.4, 126.6, 127.6, 128.1, 140.2, 174.1.

MS (EI) m/z 152 (M^+)⁺, 135, 121, 107, 90, 79, 77, 63, 51.

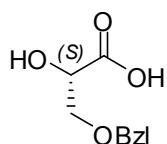
HRMS (EI) m/z ber. für $C_8H_8O_3$ (M^+)⁺ 152.0473; gef. 152.0471.

3-[(4-Benzyloxy)phenyl]-(S)-2-hydroxy-propionsäure (349). L-Tyrosin(OBzl)-OH (2283 mg, 8.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (16.0 mmol, 32.0 ml), NaNO₂ (3312 mg, 48.0 mmol) in 11.0 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 1396 mg (61%) **349** als gelblichen Feststoff.



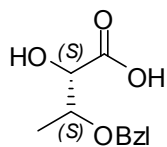
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -14.5$ ($c = 0.93$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3400, 3064, 3034, 3008, 2928, 2872, 1723, 1611, 1584, 1512, 1454, 1382, 1299, 1279, 1242, 1177, 1113, 1026, 828, 736, 696.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.70 (dd, $J = 13.90, 7.99$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J = 13.77, 4.63$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 8.06, 4.57$ Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 6.89 (d, $J = 8.73$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 8.73$ Hz, 2H), 7.29 – 7.44 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 40.0, 69.1, 71.2, 114.3, 114.7, 126.8, 127.6, 128.4, 130.4, 135.8, 156.9, 175.2.
MS (EI)	m/z 272 (M ⁺), 254, 242, 224, 210, 197, 181, 164, 152, 119, 107, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₁₆ O ₄ (M ⁺) ⁺ 272.1048; gef. 272.1052.

3-Benzyloxy-(S)-2-hydroxy-propionsäure (350). L-Serin(OBzl)-OH (2093 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO₂ (4139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 1892 mg (90%) **350** als weißen Feststoff.



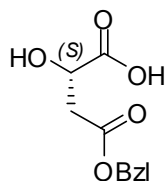
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +9.7$ ($c = 0.68$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3380, 3089, 3064, 3032, 2924, 2870, 1734, 1496, 1454, 1363, 1235, 1209, 1123, 1041, 1028, 741, 698.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.60 (d, $J = 4.30$ Hz, 2H), 4.15 (t, $J = 4.43$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 5.37$ Hz, 2H), 5.35 (br s, 1H), 7.24 – 7.37 (m, 5H), 12.57 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 70.0, 72.0, 72.3, 127.4, 127.5, 128.2, 138.3, 173.7.
MS (EI)	m/z 196 (M ⁺), 194, 166, 148, 135, 121, 107, 91, 79, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₀ H ₁₂ O ₄ (M ⁺) ⁺ 196.0735; gef. 196.0737.

3-Benzoyloxy-(S)-2-hydroxy-buttersäure (351). L-Threonin(OBzl)-OH (2030 mg, 9.7 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (19.4 mmol, 38.8 ml), NaNO₂ (4015 mg, 58.2 mmol) in 13.1 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 1652 mg (81%) **351** als weißen Feststoff.



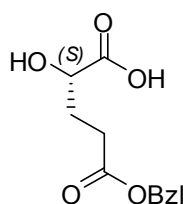
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +4.1$ ($c = 0.36$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3377, 3089, 3064, 3031, 2978, 2934, 2875, 1955, 1882, 1728, 1648, 1497, 1455, 1377, 1343, 1270, 1208, 1147, 1074, 1027, 1014, 741, 698.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.15 (d, $J = 6.45$ Hz, 3H), 3.80 – 3.86 (m, 1H), 3.95 (d, $J = 3.49$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 11.96$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 11.96$ Hz, 1H), 7.23 – 7.33 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 15.5, 70.3, 73.4, 75.8, 127.2, 127.4, 128.1, 138.8, 174.1.
MS (EI)	m/z 210 (M ⁺) ⁺ , 181, 169, 148, 135, 107, 91, 87, 79, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₁ H ₁₄ O ₄ (M ⁺) ⁺ 210.0892; gef. 210.0888.

4-(Benzoyloxy)-(S)-2-hydroxy-4-oxo-buttersäure (352). L-Aspartat(OBzl)-OH (3475 mg, 15.5 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (31.0 mmol, 62.0 ml), NaNO₂ (6416 mg, 93.0 mmol) in 21.0 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 2328 mg (67%) **352** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +9.2$ ($c = 0.82$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3437, 3091, 3066, 3034, 2956, 2898, 1735, 1653, 1498, 1456, 1387, 1357, 1268, 1215, 1172, 1104, 1043, 1030, 989, 960, 750, 699.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.63 (dd, $J = 15.58, 7.79$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 15.58, 7.79$ Hz, 1H), 4.35 (dd, $J = 7.79, 4.84$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 7.30 – 7.36 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 39.2, 65.7, 67.0, 127.9, 128.0, 128.5, 136.2, 170.3, 174.5.
MS (EI)	m/z 224 (M ⁺) ⁺ , 196, 179, 161, 144, 133, 105, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₁ H ₁₂ O ₅ (M ⁺) ⁺ 224.0684; gef. 224.0686.

5-(Benzyloxy)-(S)-2-hydroxy-5-oxo-pentansäure (353). L-Glutamat(Obzl)-OH (1472 mg, 10.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (20.0 mmol, 40.0 ml), NaNO₂ (4.139 mg, 60.0 mmol) in 13.5 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 755 mg (51%) **353** als weißen Feststoff.

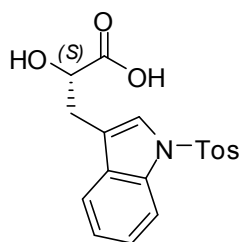


IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3381, 3091, 3066, 3034, 2957, 1791, 1737, 1608, 1587, 1498, 1456, 1388, 1359, 1271, 1213, 1168, 752, 698.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-d₆) 1.72 – 1.84 (m, 1H), 1.92 – 2.00 (m, 1H), 2.13 – 2.23 (m, 1H), 2.24 – 2.46 (m, 1H), 3.97 (dd, *J* = 8.33, 4.30 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 7.19 – 7.46 (m, 5H), 10.01 (br s, 1H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO-d₆) 29.2, 29.6, 65.5, 68.7, 128.0, 128.1, 128.5, 136.3, 172.5, 176.8.

(S)-2-Hydroxy-3-{1-[(4-methyl-phenyl)-sulfonyl]-1H-indol-3-yl}propionsäure (354). L-Tryptophan-(Tos)-OH (1078 mg, 3.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (6.0 mmol, 12.0 ml), NaNO₂ (1242 mg, 18.0 mmol) in 4.1 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 523 mg (45%) **354** als gelblichen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19.2$ (*c* = 0.55, MeOH).

IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3356, 3135, 3051, 3018, 2976, 2940, 2859, 1726, 1647, 1603, 1565, 1517, 1471, 1449, 1402, 1353, 1280, 1189, 1166, 1133, 1123, 1052, 1034, 1020, 973, 852, 743, 663.

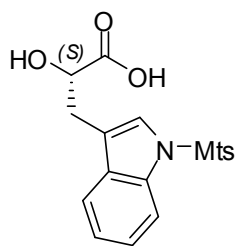
¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-d₆) 2.25 (s, 3H), 2.96 (dd, *J* = 14.91, 7.12 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 14.91, 7.12 Hz, 1H), 4.28 (dd, *J* = 7.39, 4.70 Hz, 1H), 7.11 (s, 2H), 7.20 – 7.25 (m, 4H), 7.58 (s, 1H), 7.63 – 7.73 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO-d₆) 22.0, 29.2, 69.7, 111.6, 115.9, 116.1, 120.2, 122.5, 124.2, 124.7, 130.3, 132.4, 133.9, 139.5, 144.3, 175.0.

MS (EI) *m/z* 359 (M)⁺, 314, 250, 185, 160, 132, 121, 105, 91, 79, 57.

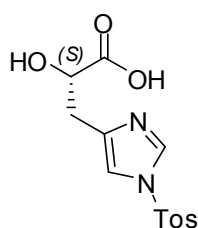
HRMS (EI) *m/z* ber. für C₁₈H₁₇NO₅S (M)⁺ 359.0827; gef. 359.0833.

(S)-2-Hydroxy-3-[1-(mesitylsulfonyl)-1H-indol-3-yl]-propionsäure (355). L-Tryptophan-(Mts)-OH (1160 mg, 3.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (6.0 mmol, 12.0 ml), NaNO₂ (1242 mg, 18.0 mmol) in 4.1 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 593 mg (51%) **355** als gelblichen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -19.8$ (c = 0.50, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3356, 3135, 3051, 3018, 2976, 2940, 1726, 1603, 1565, 1517, 1449, 1402, 1353, 1280, 1189, 1166, 1133, 1123, 1052, 1034, 973, 852, 743, 663.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.25 (s, 3H), 2.44 (s, 6H), 2.96 (dd, <i>J</i> = 15.18, 7.39 Hz, 1H), 3.08 (dd, <i>J</i> = 15.18, 7.39 Hz, 1H), 4.28 (dd, <i>J</i> = 7.39, 4.70 Hz, 1H), 7.11 (s, 2H), 7.20 – 7.23 (m, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.64 – 7.73 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 20.5, 22.0, 29.2, 69.7, 111.6, 116.1, 120.2, 122.5, 124.2, 124.7, 130.3, 132.4, 133.9, 139.5, 144.3, 175.0.
MS (EI)	<i>m/z</i> 387 (M ⁺), 357, 312, 248, 183, 158, 130, 119, 103, 91, 77, 55.
HRMS (EI)	<i>m/z</i> ber. für C ₂₀ H ₂₁ O ₅ N ₁ S (M ⁺) ⁺ 387.1140; gef. 387.1140.

(S)-2-Hydroxy-3-[1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1H-imidazol-4-yl]-propionsäure (356). L-Histidin(Tos)-OH (3712 mg, 12.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (24.0 mmol, 48.0 ml), NaNO₂ (4967 mg, 72.0 mmol) in 16.2 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 2492 mg (67%) **356** als weißen Feststoff.

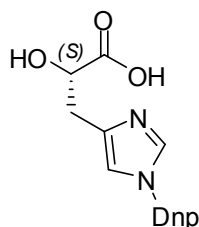


Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -28.3$ (c = 0.21, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3271, 3148, 3032, 2956, 2923, 2857, 1745, 1626, 1599, 1496, 1439, 1359, 1307, 1209, 1190, 1176, 1124, 1096, 1034, 1009, 933, 816, 769.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.28 (s, 3H), 2.88 (dd, <i>J</i> = 15.18, 8.19 Hz, 1H), 3.03 (dd, <i>J</i> = 15.18, 8.19 Hz, 1H), 4.26 (dd, <i>J</i> = 8.13, 4.37 Hz, 1H), 7.11 (d, <i>J</i> = 7.79 Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.48 (d, <i>J</i> = 8.06 Hz, 2H), 8.97 (d, <i>J</i> = 1.21 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 20.8, 29.1, 68.7, 116.8, 125.5, 128.2, 129.8, 133.7, 137.9, 145.4, 174.2.

MS (EI) m/z 311 (M+H)⁺, 293, 278, 254, 223, 197, 172, 155, 139, 123, 114, 107, 91, 77, 70, 65, 51.

HRMS (EI) m/z ber. für C₁₃H₁₅N₂O₄S(M+H)⁺ 311.0944; gef. 311.0944.

3-[1-(2,4-Dinitrophenyl)-1*H*-imidazol-4-yl]-(*S*)-2-hydroxypropionsäure (357). L-Histidin (Dnp)-OH (1606 mg, 5.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (10.0 mmol, 20.0 ml), NaNO₂ (2070 mg, 30.0 mmol) in 6.8 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 564 mg (35%) **357** als gelblichen Feststoff.



IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3311, 3148, 3032, 2956, 2923, 2858, 1749, 1626, 1599, 1496, 1439, 1359, 1209, 1190, 1176, 1124, 1096, 1034, 1009, 993, 816, 769, 683, 661.

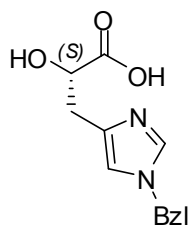
¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-*d*₆) 3.05 (dd, J = 15.11, 7.99 Hz, 1H), 3.28 (dd, J = 15.78, 6.11 Hz, 1H), 4.67 (dd, J = 7.99, 6.11 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.98 (d, J = 8.73 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.65 (dd, J = 8.73, 2.55 Hz, 1H), 8.92 (d, J = 2.69 Hz, 1H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO-*d*₆) 30.0, 74.1, 117.9, 121.3, 125.6, 128.7, 129.6, 134.5, 137.2, 139.5, 146.4, 169.9.

MS (EI) m/z 322 (M')⁺, 309, 270, 186, 172, 155, 125, 107, 91, 65, 51.

HRMS (EI) m/z ber. für C₁₂H₁₀N₄O₇ (M')⁺ 322.0549; gef. 322.0541.

3-(1-Benzyl-1*H*-imidazol-4-yl)-(S)-2-hydroxy-propionsäure (358). L-Histidin(Bzl)-OH (980 mg, 4.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (8.0 mmol, 16.0 ml), NaNO₂ (1655 mg, 24.0 mmol) in 5.4 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Diethylether). Man erhält 404 mg (41%) **358** als weißen Feststoff.



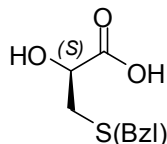
IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3299, 3148, 3030, 2956, 2923, 2857, 1745, 1626, 1599, 1496, 1439, 1359, 1209, 1190, 1176, 1124, 1034, 1009, 816.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-*d*₆) 2.85 (dd, J = 15.18, 8.19 Hz, 1H), 3.01 (dd, J = 15.18, 8.19 Hz, 1H), 4.21 – 4.25 (m, 1H), 5.38 (s, 2H), 7.34 – 7.43 (m, 5H), 7.52 (s, 1H), 7.66 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO-*d*₆) 29.2, 51.7, 68.5, 119.6, 128.3, 128.8, 129.1, 130.8, 130.9, 135.2, 174.3.

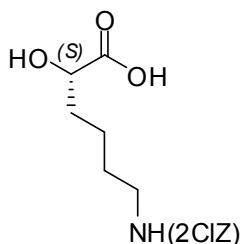
MS (EI)	m/z 247 (M+H) ⁺ , 217, 203, 184, 136, 107, 91, 65.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O ₃ (M+H) ⁺ 247.1082; gef. 247.1088.

3-Benzylsulfanyl-(S)-2-hydroxy-propionsäure (359). L-Cystein(Bzl)-OH (1000 mg, 4.7 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (9.5 mmol, 19.0 ml), NaNO₂ (1958 mg, 28.4 mmol) in 6.4 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 433 mg (43%) **359** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -3.8$ ($c = 0.72$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3170, 3085, 3061, 3029, 2963, 2924, 1719, 1602, 1558, 1494, 1453, 1417, 1376, 1242, 1179, 1072, 1028, 702.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.58 (dd, $J = 13.57, 6.85$ Hz, 1H), 2.69 (dd, $J = 13.60, 6.92$ Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 4.12 (dd, $J = 6.85, 4.84$ Hz, 1H), 7.23 – 7.34 (m, 5H), 7.99 (s, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 34.8, 35.2, 70.3, 126.8, 128.4, 128.9, 138.3, 174.1.

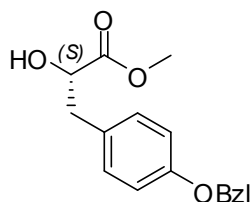
6-({[(2-Chlorbenzyl)oxy]carbonyl}amino)-(S)-2-hydroxy-hexansäure (360). L-Lysin-(2ClZ)-OH (2283 mg, 7.0 mmol), 0.5 M H₂SO₄ (14.0 mmol, 28.0 ml), NaNO₂ (2898 mg, 42.0 mmol) in 9.5 ml dest. H₂O. Die Reinigung erfolgt mittels Umkristallisation (*n*-Hexan/Ethylacetat). Man erhält 486 mg (22%) **360** als weißen Feststoff.



IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3336, 3069, 2940, 2868, 1720, 1645, 1597, 1522, 1445, 1398, 1349, 1253, 1136, 1058, 1040, 850, 756.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.19 – 1.29 (m, 2H), 1.32 – 1.45 (m, 2H), 1.47 – 1.65 (m, 1H), 1.69 – 1.87 (m, 1H), 2.97 (dd, $J = 12.36, 6.45$ Hz, 2H), 3.67 – 3.72 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 5.57 (s, 1H), 7.34 – 7.46 (m, 2H), 7.52 (dd, $J = 6.99, 2.41$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J = 6.99, 2.42$ Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 22.1, 29.2, 33.7, 40.8, 66.6, 69.6, 127.3, 129.3, 129.7, 130.6, 130.8, 134.7, 155.8, 176.0.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der Hydroxysäureester (361 – 366)

Zu einem α -L-Hydroxysäuremethylester (1.0 mmol) in Methanol (900.0 mmol, 36.6 ml), wird bei Raumtemperatur eine 2 M Lösung von TMSCHN₂ (6.0 mmol, 13.7 ml) in Hexan langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin werden die flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat) aufgereinigt.

3-[(4-(Benzyloxy)phenyl]-2-(S)-hydroxy-propionsäure-1-methylester (361). (S)-2-

Hydroxysäure **349** (1361 mg, 5.0 mmol), Methanol (4500 mmol, 183.0 ml), TMSCHN₂ (30.0 mmol, 68.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 4:1). Man erhält 1194 mg (89%) **361** als einen gelblichen Feststoff

DC

$R_f = 0.35$ (*n*-Hexan/EtOAc = 3:1).

IR

ν_{\max} (cm⁻¹) 3412, 3065, 3034, 3007, 2953, 2930, 2871, 1740, 1689, 1600, 1584, 1577, 1511, 1454, 1437, 1383, 1301, 1247, 1175, 1161, 1114, 1025, 833, 738, 697.

¹H-NMR

δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 2.73 (dd, $J = 13.70, 7.93$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 13.70, 7.93$ Hz, 1H), 3.58 (s, 1H), 4.16 (dd, $J = 7.93, 5.10$ Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 6.87 – 6.90 (m, 2H), 7.08 – 7.11 (m, 2H), 7.29 – 7.33 (m, 1H), 7.37 – 7.44 (m, 4H).

¹³C-NMR

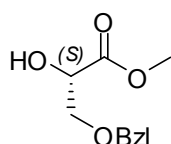
δ_C (100 MHz; DMSO-d₆) 39.2, 51.4, 69.1, 71.4, 114.4, 127.6, 127.8, 128.4, 129.7, 130.3, 137.2, 156.9, 174.0.

MS (EI)

m/z 286 (M⁺), 258, 242, 230, 212, 197, 181, 165, 152, 133, 121, 105, 91, 77, 65, 51.

HRMS (EI)

m/z ber. für C₁₇H₁₈O₄ (M⁺)⁺ 286.1205; gef. 286.1205.

3-(Benzyloxy)-(S)-2-hydroxy-propionsäure-1-methylester (362). (S)-2-Hydroxysäure 350

(980 mg, 5.0 mmol), Methanol (4500 mmol, 183.0 ml), TMSCHN₂ (30.0 mmol, 68.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 4:1). Man erhält 883 mg (84%) **362** als weißen Feststoff.

DC

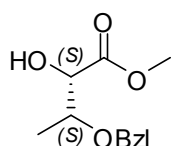
$R_f = 0.40$ (*n*-Hexan/EtOAc = 4:1).

IR

ν_{\max} (cm⁻¹) 3456, 3088, 3063, 3030, 3006, 2953, 2923, 2866, 1743, 1496, 1453, 1439, 1362, 1236, 1212, 1126, 1043, 1028, 740, 699.

$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.32 (s, 1H), 3.59 (d, J = 4.97 Hz, 2H), 3.63 (s, 3H), 4.23 – 4.25 (m, 1H), 4.45 – 4.53 (m, 2H), 7.25 – 7.29 (m, 3H), 7.32 – 7.36 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 51.5, 70.0, 71.7, 72.3, 127.4, 127.5, 128.2, 138.2, 172.7.
MS (EI)	m/z 210 (M^+), 180, 162, 149, 131, 121, 107, 91, 77, 65, 59, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 210.0892; gef. 210.0893.

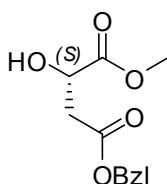
3-(Benzyloxy)-2-(S)-hydroxy-buttersäure-1-methylester (363). (S)-2-Hydroxysäure **351**



(1050 mg, 5.0 mmol), Methanol (4500 mmol, 183.0 ml), TMSCHN₂ (30.0 mmol, 68.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 885 mg (79%) **363** als weißen Feststoff.

DC	R_f = 0.3 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3498, 3089, 3064, 3030, 2976, 2952, 2934, 2872, 1745, 1648, 1497, 1454, 1440, 1398, 1375, 1343, 1279, 1208, 1149, 1092, 1075, 1027, 1016, 741, 699.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.14 (d, J = 6.45 Hz, 3H), 3.32 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.76 – 3.82 (m, 1H), 4.06 (dd, J = 7.12, 3.63 Hz, 1H), 4.38 (d, J = 12.09 Hz, 1H), 4.52 (d, J = 12.09 Hz, 1H), 7.23 – 7.27 (m, 3H), 7.31 – 7.34 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 15.2, 51.3, 70.1, 73.4, 75.5, 127.3, 127.5, 128.1, 138.6, 172.8.
MS (EI)	m/z 224 (M^+), 189, 162, 149, 135, 118, 101, 91, 79, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 224.1048; gef. 224.1050.

(S)-2-Hydroxy-butandisäure-4-benzylester-1-methylester (364). (S)-2-Hydroxysäure **352**

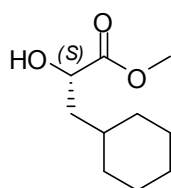


(2242 mg, 10.0 mmol), Methanol (9000 mmol, 366.0 ml), TMSCHN₂ (60 mmol, 137.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1548 mg (65%) **364** als weißen Feststoff.

DC	R_f = 0.37 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3491, 3004, 2956, 2925, 2853, 1732, 1438, 1366, 1265, 1213, 1199, 1166, 1102, 1043, 991.

¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.65 (dd, J = 15.72, 7.39 Hz, 1H), 2.77 (dd, J = 15.72, 7.39 Hz, 1H), 3.60 (s, 3H), 4.38 – 4.43 (m, 1H), 5.75 (s, 2H), 7.19 – 7.24 (m, 3H), 7.29 – 7.37 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 39.0, 51.7, 62.9, 65.6, 126.4, 126.6, 128.0, 142.5, 172.5, 173.1.
MS (EI)	m/z 238 (M^+), 208, 180, 148, 130, 122, 107, 91, 79, 74, 65, 59.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{12}H_{14}O_5$ (M^+) ⁺ 238.0841; gef. 238.0847.

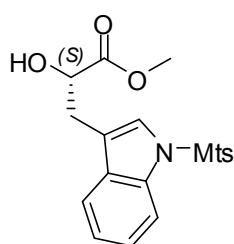
3-Cyclohexyl-(S)-2-hydroxy-propionsäure-1-methylester (365). (S)-2-Hydroxysäure **344**



(862 mg, 5.0 mmol), Methanol (4500 mmol, 183.0 ml), TMSCHN₂ (30.0 mmol, 68.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 847 mg (91%) **365** als farbloses Öl.

DC	R_f = 0.30 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
IR	ν_{max} (cm ⁻¹) 3487, 2923, 2852, 1738, 1648, 1449, 1275, 1247, 1209, 1175, 1144, 1098, 1078, 1055, 1013.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.76 – 0.94 (m, 2H), 1.04 – 1.24 (m, 4H), 1.38 – 1.45 (m, 3H), 1.56 – 1.76 (m, 5H), 3.60 (s, 3H), 4.03 – 4.08 (m, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 25.6, 25.8, 26.0, 31.8, 33.1, 33.4, 41.4, 51.3, 67.7, 175.2.
MS (EI)	m/z 186 (M^+), 168, 154, 141, 127, 109, 90, 83, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{10}H_{18}O_3$ (M^+) ⁺ 186.1255; gef. 186.1261.

(S)-2-Hydroxy-3-[1-mesitylsulfonyl-1H-indol-3-yl]-propionsäure-1-methylester (366).



(S)-2-Hydroxysäure **355** (1937 mg, 5.0 mmol), Methanol (4500 mmol, 183.0 ml), TMSCHN₂ (30.0 mmol, 68.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/EtOAc = 3:1). Man erhält 1244 mg (62%) **366** als einen gelblichen Feststoff.

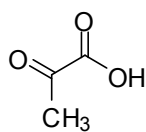
DC	R_f = 0.30 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
IR	ν_{max} (cm ⁻¹) 3356, 3135, 3051, 3018, 2976, 2940, 2859, 1726, 1647, 1603, 1565, 1517, 1471, 1449, 1402, 1353, 1280, 1189, 1166, 1133, 1123, 1052, 1034, 973, 852, 743, 663.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.25 (s, 3H), 2.44 (s, 6H), 2.96 (dd, J = 15.04, 7.25 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 15.04, 7.25 Hz, 1H), 3.55 (s, 3H), 4.29 (dd,

	$J = 7.39, 4.70 \text{ Hz, } 1\text{H}), 7.11 \text{ (s, } 2\text{H}), 7.20 - 7.25 \text{ (m, } 3\text{H}), 7.58 \text{ (s, } 1\text{H}), 7.63 - 7.70 \text{ (m, } 2\text{H}).$
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 20.5, 22.0, 29.2, 52.2, 69.7, 111.6, 116.1, 120.2, 122.5, 124.2, 124.7, 130.3, 132.4, 133.8, 139.5, 144.3, 169.9.
MS (EI)	m/z 401 (M^+), 371, 357, 342, 326, 312, 264, 248, 232, 218, 200, 183, 160, 146, 130, 119, 103, 91, 77, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{N}_1\text{S}_1$ (M^+) ⁺ 401.1296; gef. 401.1279.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der α -Oxosäuren (367 - 378)

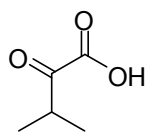
Die Periodsäure (1.05 mmol) wird über einen Zeitraum von 15 min bei Raumtemperatur in Acetonitril (10.0 ml) gelöst. Danach wird die Lösung auf 0 °C gekühlt und eine Lösung einer α -L-Hydroxysäure oder α -L-Hydroxysäureester (1.0 mmol) in Acetonitril (1.0 ml) zugesetzt. Nach 5 min erfolgt die Zugabe von PCC (2.0 mol%) in Acetonitril (2.0 ml). Die Reaktionslösung wird für weitere 2 bis 4 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und für weitere 10 min gerührt. Der Reaktionslösung wird in ein Gemisch aus ges. NaCl/ H_2O (1:1, 10 ml) gegossen und anschließend die Phasen getrennt. Schließlich wird die organische Phase nacheinander mit jeweils 10 ml der folgenden Lösungen gewaschen ges. Na_2SO_3 , ges. NaCl. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt war in den meisten Fällen nach der Aufarbeitung ausreichend rein um es ohne weitere Aufreinigung einzusetzen. Verunreinigte Rohprodukte wurden mittels einer Kieselgelsäule ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) aufgereinigt.

2-Oxo-propionsäure (367). 2-Hydroxy-propionsäure **338** (900 mg, 10.0 mmol), H_5IO_6 (2393 mg, 10.5 mmol), PCC (43 mg, 2 mol%), CH_3CN (130 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **367** war nicht notwendig. Man erhält 572 mg (65%) **367** als gelbes Öl.



IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3211, 3110, 2992, 2941, 1746, 1659, 1452, 1383, 1228, 1201, 1135, 1120, 1092.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.33 (s, 3H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 26.4, 162.4, 194.2.
MS (EI)	m/z 88 (M^+), 56, 43, 29, 15.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$ (M^+) ⁺ 88.0160; gef. 88.0133.

3-Methyl-2-oxo-buttersäure (368). 2-Hydroxy-3-methyl-buttersäure **339** (1181 mg, 10.0 mmol), H_5IO_6 (2393 mg, 10.5 mmol), PCC (43 mg, 2 mol%), CH_3CN (130 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **368** war nicht notwendig. Man erhält 836 mg (72%) **368** als gelbliches Öl.



IR ν_{max} (cm^{-1}) 2970, 2932, 2873, 1708, 1630, 1468, 1447, 1401, 1384, 1367, 1334, 1230, 1123, 809.

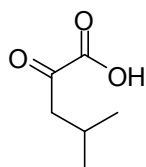
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.97 (d, $J = 7.07$ Hz, 6H), 2.85 – 2.95 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 17.6, 35.9, 169.1, 209.6.

MS (CI) m/z 116 (M^+), 109, 91, 81, 69, 58, 55.

HRMS (CI) m/z ber. für $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ (M^+) 116.0473; gef. 116.0477.

4-Methyl-2-oxo-valeriansäure (369). 2-Hydroxy-4-methyl-valeriansäure **340** (1320 mg, 10.0 mmol), H_5IO_6 (2393 mg, 10.5 mmol), PCC (43 mg, 2 mol%), CH_3CN (130 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **369** war nicht notwendig. Man erhält 1028 mg (79%) **369** als gelblichen Feststoff.



IR ν_{max} (cm^{-1}) 2961, 2934, 2874, 1728, 1647, 1469, 1390, 1370, 1283, 1218, 1141, 1049.

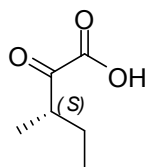
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.84 (d, $J = 6.57$ Hz, 6H), 1.95 – 2.05 (m, 1H), 2.38 (d, $J = 6.82$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.2, 23.6, 47.0, 163.2, 196.5.

MS (EI) m/z 132 (M^+), 114, 103, 99, 85, 69, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$ (M^+) 132.0786; gef. 132.0787.

3-Methyl-2-oxo-valeriansäure (370). 2-Hydroxy-3-methyl-valeriansäure **341** (1320 mg, 10.0 mmol), H_5IO_6 (2393 mg, 10.5 mmol), PCC (43 mg, 2 mol%), CH_3CN (130 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **370** war nicht notwendig. Man erhält 1053 mg (81%) **370** als weißen Feststoff.



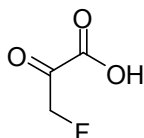
IR ν_{max} (cm^{-1}) 2969, 2936, 2880, 1730, 1460, 1437, 1381, 1269, 1255, 1164, 1052, 1013.

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.83 (t, $J = 7.46$ Hz, 3H), 1.03 (d, $J = 6.98$ Hz, 3H), 1.32 – 1.39 (m, 1H), 1.61 – 1.68 (m, 1H), 3.03 – 3.12 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 11.0, 14.3, 24.3, 42.8, 161.8, 197.5.

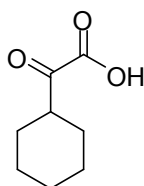
MS (EI)	m/z 85 (M-CO ₂ H) ⁺ , 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₆ H ₉ O (M-CO ₂ H) ⁺ 85.0653; gef. 85.0655.

3-Fluor-2-oxo-propionsäure (371). 3-Fluor-2-hydroxy-propionsäure **342** (1080 mg, 10.0 mmol), H₅IO₆ (2393 mg, 10.5 mmol), PCC (43 mg, 2 mol%), CH₃CN (130 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **371** war nicht notwendig. Man erhält 477 mg (45%) **371** als gelbes Öl.



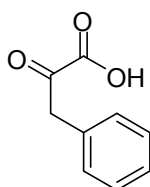
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3436, 3011, 2961, 2926, 2855, 1736, 1454, 1441, 1261, 1239, 1156, 1082, 965, 754.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 5.44 (s, 1H), 5.55 (s, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 83.9, 85.6, 160.0, 160.1, 189.0, 189.1.
MS (EI)	m/z 107 (M+H) ⁺ , 97, 83, 69, 61, 57, 41, 33, 29, 27, 15.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₃ H ₄ F ₁ O ₃ (M+H) ⁺ 107.0144; gef. 107.0140.

Cyclohexyl-2-oxo-essigsäure (372). Cyclohexyl-2-hydroxy-essigsäure **345** (1582 mg, 10.0 mmol), H₅IO₆ (2393 mg, 10.5 mmol), PCC (43 mg, 2 mol%), CH₃CN (130 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **372** war nicht notwendig. Man erhält 1170 mg (75%) **372** als farbloses Öl.



IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3175, 2932, 2856, 1719, 1451, 1356, 1349, 1326, 1305, 1288, 1236, 1182, 1141, 1083, 1066, 994.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.06 – 1.34 (m, 7H), 1.58 – 1.69 (m, 3H), 2.87 – 2.94 (m, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 24.8, 25.4, 27.1, 45.3, 163.9, 199.6.
MS (EI)	m/z 111 (M-CO ₂ H) ⁺ , 95, 83, 69, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₇ H ₁₁ O ₁ (M-CO ₂ H) ⁺ 111.0809; gef. 111.0801.

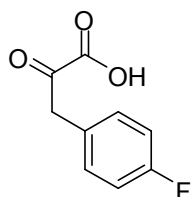
2-Oxo-3-phenyl-propionsäure (373). 2-Hydroxy-3-phenyl-propionsäure **346** (3320 mg, 20.0 mmol), H₅IO₆ (4786 mg, 21.0 mmol), PCC (86 mg, 2 mol%), CH₃CN (260 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **373** war nicht notwendig. Man erhält 2756 mg (83%) **373** als weißen Feststoff.



IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3363, 3062, 3029, 2964, 2930, 2853, 1711, 1595, 1496, 1453, 1393, 1340, 1330, 1218, 1126, 1083, 1057, 1043, 698.
-----------	---

$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 6.39 (s, 1H), 7.22 (t, $J = 7.39$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 7.59$ Hz, 2H), 7.74 (d, $J = 7.39$ Hz, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 109.5, 127.2, 128.3, 129.3, 135.0, 141.9, 166.3.
MS (EI)	m/z 164 (M^+), 147, 118, 107, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$ (M^+) 164.0473; gef. 164.0473.

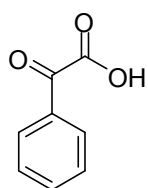
4-Fluor-2-oxo-3-phenyl-propionsäure (374). 4-Fluor-2-Hydroxy-3-phenylpropionsäure **347**



(920 mg, 5.0 mmol), H_5IO_6 (1197 mg, 5.3 mmol), PCC (22 mg, 2 mol%), CH_3CN (65 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **374** war nicht notwendig. Man erhält 646 mg (71%) **374** als weißen Feststoff.

IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3074, 3043, 2930, 2859, 1717, 1510, 1439, 1418, 1363, 1223, 1160, 1112, 1085, 824.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 4.01 (q, $J = 7.12$ Hz, 1H), 6.40 (s, 1H, Enol), 7.09 – 7.18 (m, 2H), 7.25 – 7.30 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 39.6, 114.8, 115.0, 131.2, 131.3, 141.5, 141.6, 159.5, 159.9, 162.2, 192.0.
MS (EI)	m/z 182 (M^+), 162, 154, 136, 123, 109, 91, 83, 77, 63, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_7\text{F}_1\text{O}_3$ (M^+) 182.0379; gef. 182.0377.

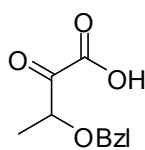
2-Oxo-phenyl-essigsäure (375). Hydroxy-phenyl-essigsäure **348** (3040 mg, 20.0 mmol),



H_5IO_6 (4786 mg, 21.0 mmol), PCC (86 mg, 2 mol%), CH_3CN (260 ml). Eine zusätzliche Reinigung von **375** war nicht notwendig. Man erhält 2670 mg (89%) **375** als weißen Feststoff.

IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3169, 3067, 2978, 2934, 2665, 2559, 1974, 1741, 1685, 1596, 1579, 1451, 1370, 1213, 1178, 1002, 977, 658.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 7.61 (t, $J = 7.71$ Hz, 2H), 7.76 (t, $J = 7.33$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 7.07$ Hz, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 129.4, 129.5, 131.9, 135.2, 166.2, 188.8.
MS (EI)	m/z 150 (M^+), 122, 105, 85, 77, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$ (M^+) 150.0316; gef. 150.0314.

3-Benzoyloxy-2-oxo-buttersäure (376). 3-Benzoyloxy-2-hydroxy-buttersäure **351** (1050 mg, 5.0 mmol), H_5IO_6 (1197 mg, 5.3 mmol), PCC (22 mg, 2 mol%), CH_3CN (65 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9:1$). Man erhält 645 mg (62%) **376** als weißen Feststoff.



IR ν_{max} (cm^{-1}) 3089, 3064, 3032, 2981, 2934, 2875, 1954, 1881, 1727, 1649, 1603, 1586, 1454, 1377, 1343, 1273, 1209, 1147, 1088, 1073, 1027, 1014, 740, 698.

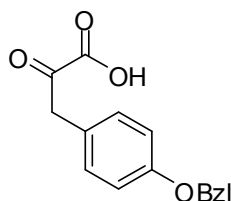
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 1.15 (d, $J = 6.45$ Hz, 3H), 3.82 – 3.86 (m, 1H), 4.38 – 4.43 (m, 1H), 4.52 – 4.60 (m, 1H), 7.22 – 7.33 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 15.5, 70.2, 75.8, 127.2, 127.4, 128.0, 138.8, 174.1, 193.2.

MS (EI) m/z 209 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 181, 167, 155, 148, 135, 121, 107, 91, 77, 65, 51.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 209.0813; gef. 209.0813.

3-[4-Benzoyloxy]phenyl]-2-oxo-propionsäure (377). 3-[4-(Benzoyloxy)phenyl]-2-hydroxy-propionsäure **349** (2720 mg, 10.0 mmol), H_5IO_6 (2394 mg, 10.6 mmol), PCC (44 mg, 2 mol%), CH_3CN (130 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9:1$). Man erhält 810 mg (30%) **377** als weißen Feststoff.



IR ν_{max} (cm^{-1}) 3412, 3065, 3034, 3007, 2953, 2930, 2871, 1740, 1689, 1600, 1584, 1577, 1511, 1454, 1437, 1383, 1301, 1247, 1175, 1161, 1114, 1025, 833, 738, 697.

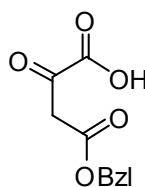
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 5.07 (m, 2H), 6.36 (s, 1H), 6.90 – 7.00 (m, 2H), 7.11 – 7.29 (m, 2H), 7.31 – 7.45 (m, 4H), 7.69 – 7.71 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 69.2, 114.6, 114.7, 120.2, 127.6, 127.7, 128.4, 130.4, 130.8, 137.5, 144.8, 157.5, 183.4.

MS (EI) m/z 270 (M^+)⁺, 242, 228, 211, 197, 181, 165, 152, 137, 120, 107, 91, 77, 69, 65.

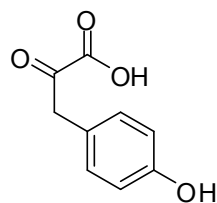
HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (M^+)⁺ 270.0892; gef. 270.0893.

4-(Benzoyloxy)-2,4-di-oxo-buttersäure (378). 2-Hydroxy-butandisäure-4-benzylester **352** (1120 mg, 5.0 mmol), H_5IO_6 (1197 mg, 5.3 mmol), PCC (22 mg, 2 mol%), CH_3CN (65 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9:1$). Man erhält 522 mg (47%) **378** als weißen Feststoff.



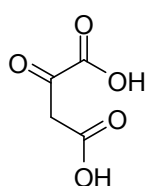
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3115, 3091, 3066, 3035, 2960, 1736, 1657, 1631, 1499, 1456, 1393, 1258, 1214, 1110, 1003, 970, 787, 751, 697.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.93 (s, 2H, Keto), 5.13 (s, 2H, Enol), 5.19 (s, 2H, Keto), 5.81 (s, 1H, Enol), 7.32 – 7.34 (m, 5H, Enol), 7.36 – 7.39 (5H, Keto).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 45.0 (Enol), 65.7 (Enol), 66.2 (Keto), 95.9 (Enol), 127.9 (Enol), 128.0 (Keto), 128.1 (Keto), 128.3 (Keto), 128.4 (Enol), 128.5 (Enol), 135.6 (Keto), 135.9 (Enol), 157.6 (Enol), 161.1 (Keto), 163.3 (Keto), 166.8 (Enol), 168.0 (Enol), 188.8 (Keto).
MS (EI)	m/z 222 (M ⁺) ⁺ , 194, 170, 158, 130, 122, 108, 91, 79, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₁ H ₁₂ O ₅ (M ⁺) ⁺ 222.0528; gef. 222.0531.

3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-oxo-propionsäure (379). Zu einer gut gerührten Lösung von Methanol (36.0 ml) und 2-Hydroxy-3-(4-hydroxy-phenyl)-propionsäure **377** (270 mg, 1.0 mmol), wird unter Schutzgasstrom (Argon) Pd/C 10% (810 mg) zugegeben. Nachdem die Apparatur mit H₂ gesättigt wurde wird die Suspension für 4 h bei Raumtemperatur gerührt, und danach gefiltert (Rotalibo®-syringe Filter, PTFE, 0.45 µm). Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt, und man erhält 178 mg (98%) **379** als weißen Feststoff.



IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3357, 3031, 2956, 2930, 2850, 2755, 2616, 1737, 1674, 1602, 1583, 1514, 1443, 1382, 1309, 1240, 1217, 1174, 1158, 1108, 1066, 861, 835.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 6.32 (s, 1H, Enol), 6.71 – 6.75 (m, 2H), 7.57 – 7.60 (m, 2H), 8.79 (br s, 1H), 9.58 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 110.4, 115.2, 126.0, 131.0, 139.3, 156.9, 166.7.
MS (EI)	m/z 180 (M ⁺) ⁺ , 163, 152, 134, 121, 107, 95, 89, 77, 67, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₈ O ₄ (M ⁺) ⁺ 180.0422; gef. 180.0420.

2-Oxo-succinat (380). Zu einer gut gerührten Lösung von Methanol (36.0 ml) und 2-Hydroxysuccinat **378** (225 mg, 1.0 mmol), wird unter Schutzgasstrom (Argon) Pd/C 10% (810 mg) zugegeben. Nachdem die Apparatur mit H₂ gesättigt wurde wird die Suspension für 4 h bei Raumtemperatur gerührt, und danach gefiltert (Rotalibo®-syringe Filter, PTFE, 0.45 µm). Das



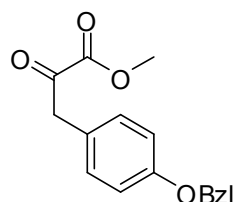
Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt, und man erhält 130 mg (99%) **380** als weißen Feststoff.

IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 2997, 2857, 2798, 2625, 2511, 1716, 1692, 1638, 1421, 1298, 1217, 1111.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.72 (s, 2H, Keto), 5.79 (s, 1H, Enol), 8.97 (s br, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 43.7 (Keto), 94.7 (Enol), 158.4 (Enol), 160.9 (Keto), 161.5 (Enol), 167.0 (Keto), 171.5 (Enol), 192.7 (Keto).
MS (EI)	m/z 132 (M^+), 121, 111, 97, 87, 69, 60.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5$ (M^+) 132.0058; gef. 132.0041.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der α -Oxosäuren und α -Oxosäureester (381 - 387)

Eine α -L-Hydroxysäure oder ein α -L-Hydroxysäureester (1.0 mmol) wird in DCM (10.0 ml) gelöst, auf -5°C abgekühlt und mit Dess-Martin-Reagenz (1270 mg, 3.0 mmol) versetzt. Die heterogene Mischung wird langsam auf 25°C erwärmt und für 90 min gerührt. Schließlich wird mit 20.0 ml Diethylether verdünnt, in eine gesättigte NaHCO_3 -Lsg. (45.0 ml) geschüttet und solange gerührt, bis sich zwei Phasen bilden. Die beiden Phasen werden separiert, wonach die wässrige Phase dreimal mit Diethylether (jeweils 60.0 ml) extrahiert wird. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (60.0 ml) und anschließend mit brine (60.0 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 werden die flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck entfernt, wodurch man die α -Oxosäuren bzw. α -Oxosäureester nahezu quantitativ erhält und roh der nächsten Stufe zuführen kann. Das Rohprodukt war in den meisten Fällen nach der Aufarbeitung ausreichend rein um es ohne weitere Aufreinigung einzusetzen. Verunreinigte Rohprodukte wurden mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat) aufgereinigt.

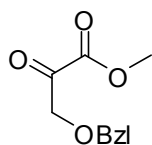
3-[4-(Benzyloxy)phenyl]-(S)-2-hydroxy-propionsäure-1-methylester (381). 3-[(4-Benzyl-oxy)phenyl]-2-hydroxy-propionsäure-1-methylester **361** (860 mg, 3.0 mmol), DCM (30.0 ml), Dess-Martin-Reagenz (3810 mg, 9.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 4:1). Man erhält 630 mg (74%) **381** als weißen Feststoff.



DC $R_f = 0.30$ (*n*-Hexan/EtOAc = 5:1).

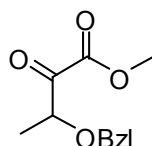
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3065, 3034, 3007, 2953, 2930, 2871, 1740, 1689, 1600, 1584, 1577, 1511, 1454, 1437, 1383, 1301, 1247, 1175, 1161, 1114, 1025, 833, 738, 697.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 1.52 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 6.26 (s, 1H), 6.95 (d, J = 8.87 Hz, 2H), 7.33 – 7.46 (m, 5H), 7.53 (d, J = 15.85 Hz, 2H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 28.2, 70.0, 80.2, 115.1, 117.8, 127.5, 127.6, 128.1, 128.6, 129.5, 136.5, 143.1, 160.3, 166.7.
MS (EI)	m/z 284 (M ⁺) ⁺ , 256, 228, 212, 197, 181, 165, 152, 133, 121, 105, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₇ H ₁₆ O ₄ (M ⁺) ⁺ 284.1048; gef. 284.1052.

3-(Benzyloxy)-2-oxo-propionsäure-1-methylester (382). 3-(Benzyloxy)-2-hydroxy-propionsäure-1-methylester **362** (1050 mg, 5.0 mmol), DCM (50.0 ml), Dess-Martin-Reagenz (6350 mg, 15.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 822 mg (79%) **382** als farbloses Öl.



DC	R_f = 0.35 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3088, 3064, 3031, 3006, 2953, 2925, 2868, 1742, 1496, 1453, 1439, 1363, 1272, 1238, 1215, 1127, 1047, 1028, 741, 699.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.66 (s, 3H), 4.16 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 7.30 – 7.37 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 51.5, 71.7, 72.3, 127.4, 127.5, 128.2, 138.2, 172.7, 193.3.
MS (EI)	m/z 209 (M+H) ⁺ , 181, 161, 149, 131, 121, 105, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₁ H ₁₃ O ₄ (M+H) ⁺ 209.0813; gef. 209.0813.

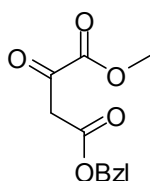
3-(Benzyloxy)-2-oxo-buttersäure-1-methylester (383). 3-(Benzyloxy)-2-hydroxy-buttersäure-1-methylester **363** (1120 mg, 5.0 mmol), DCM (50.0 ml), Dess-Martin-Reagenz (6350 mg, 15.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 900 mg (81%) **383** als farbloses Öl.



DC	R_f = 0.38 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3089, 3064, 3031, 2980, 2953, 2935, 2873, 1744, 1649, 1603, 1585, 1497, 1454, 1440, 1397, 1375, 1343, 1275, 1209, 1150, 1094, 1074, 1027, 1016, 741, 699.

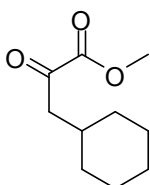
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.15 (d, J = 6.31 Hz, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.78 (m, 1H), 4.06 (d, J = 3.63 Hz, 2H), 7.22 – 7.27 (m, 3H), 7.29 – 7.36 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 15.3, 51.3, 70.1, 75.5, 127.3, 127.5, 128.1, 138.6, 172.8, 193.3.
MS (EI)	m/z 221 (M-H) $^+$, 194, 189, 162, 145, 135, 118, 105, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_4$ (M-H) $^+$ 221.0813; gef. 221.0819.

4-Benzyl-1-methyl-2-oxo-succinat (384). Butandisäure-2-hydroxy-4-benzylester-1-methylester **364** (1190 mg, 5.0 mmol), DCM (50.0 ml), Dess-Martin-Reagenz (6350 mg, 15.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 4:1). Man erhält 744 mg (63%) **384** als gelblichen Feststoff.



DC	R_f = 0.30 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 4:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3113, 3091, 3066, 3034, 3010, 2956, 2925, 2894, 1785, 1742, 1683, 1660, 1599, 1498, 1456, 1439, 1384, 1265, 1215, 1173, 1109, 1049, 1010, 754, 698.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.64 (s, 3H), 3.78 (d, J = 7.39 Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 7.20 – 7.23 (m, 3H), 7.31 (d, J = 8.36 Hz, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 45.0, 53.4, 65.9, 127.8, 128.1, 128.5, 135.7, 160.4, 166.8, 186.1.
MS (EI)	m/z 236 (M) $^+$, 210, 192, 179, 168, 160, 150, 131, 121, 107, 91, 79, 71, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ (M) $^+$ 236.0685; gef. 236.0684.

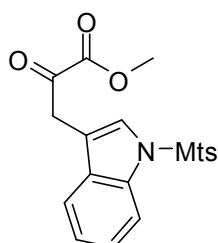
3-Cyclohexyl-2-oxo-propionsäure-1-methylester (385). 3-Cyclohexyl-2-hydroxy-propionsäure-1-methylester **365** (930 mg, 5.0 mmol), DCM (50.0 ml), Dess-Martin-Reagenz (6350 mg, 15.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 838 mg (91%) **385** als farbloses Öl.



DC	R_f = 0.35 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 6:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 2925, 2853, 1753, 1730, 1647, 1449, 1438, 1397, 1355, 1301, 1291, 1267, 1246, 1204, 1170, 1148, 1099, 1058, 1049.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.90 – 0.94 (m, 1H), 1.11 – 1.23 (m, 3H), 1.58 – 1.77 (m, 7H), 2.68 (d, J = 6.72 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 25.5, 25.7, 32.3, 32.6, 45.8, 52.6, 161.2, 193.4.
MS (EI)	m/z 184 (M^+), 167, 153, 141, 125, 107, 97, 83, 67, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$ (M^+), 184.1099; gef. 184.1102.

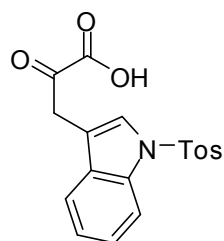
3-[(1-Mesitylsulfonyl)-1H-indol-3-yl]-2-oxo-propionsäure-1-methylester (386) 2-Hydroxy-



3-[(1-mesitylsulfonyl)-1H-indol-3-yl]-1-methylester **366** (1200 mg, 3.0 mmol), DCM (30.0 ml), Dess-Martin-Reagenz (3810 mg, 9.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 515 mg (43%) **386** als gelblichen Feststoff.

DC	$R_f = 0.40$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3278, 3027, 3018, 2975, 2952, 2942, 2856, 1796, 1740, 1649, 1603, 1565, 1495, 1449, 1402, 1356, 1279, 1189, 1166, 1133, 1124, 1054, 1034, 1020, 973, 854, 748, 663.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.24 (s, 3H), 2.42 (s, 6H), 3.16 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 6.74 (s, 1H), 7.10 – 7.27 (m, 4H), 7.57 – 7.74 (s, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 20.6, 22.0, 22.1, 37.0, 48.7, 111.8, 112.9, 120.2, 122.9, 124.7, 130.0, 132.2, 136.1, 137.9, 139.6, 142.0, 161.7, 190.0.
MS (EI)	m/z 400 ($\text{M}+\text{H}^+$), 383, 371, 342, 327, 312, 302, 262, 248, 238, 218, 183, 160, 146, 130, 119, 116, 103, 91, 77, 59.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_1\text{S}_1$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 400.1218; gef. 400.1222.

3-{1-[(4-Methylphenyl)sulfonyl]-1H-indol-3-yl}-2-oxo-propionsäure (387). 2-Hydroxy-3-

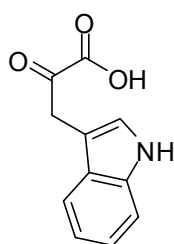


{1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1H-indol-3-yl}propionsäure **354** (1077 mg, 3.0 mmol), DCM (30.0 ml), Dess-Martin-Reagenz (3810 mg, 9.0 mmol). Man erhält 718 mg (67%) **387** als gelblichen Feststoff.

IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3348, 3210, 3179, 3137, 3108, 3068, 2952, 2926, 2878, 2589, 2100, 1719, 1597, 1522, 1487, 1459, 1431, 1369, 1312, 1261, 1248, 1190, 1176, 1140, 1119, 1097, 1082, 747, 728, 709, 683.
-----------	---

$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 2.34 (s, 3H), 3.58 (s, 2H), 7.10 – 7.18 (m, 2H), 7.34 (d, J = 8.06 Hz, 1H), 7.87 – 7.89 (m, 3H), 8.00 (d, J = 2.96 Hz, 1H), 8.34 – 8.39 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.1, 106.4, 112.2, 118.4, 120.8, 122.6, 123.8, 127.9, 129.6, 130.8, 133.5, 135.7, 144.0, 145.3, 162.6.
MS (EI)	m/z 357 (M^+), 312, 248, 183, 160, 157, 129, 103, 91, 65.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_1\text{O}_5\text{S}_1$ (M^+) 357.0671; gef. 357.0678.

3-(1H-Indol-3-yl)-2-oxo-propionsäure (388). 2-Hydroxy-3-(1H-indol-3-yl)-propionsäure **387**

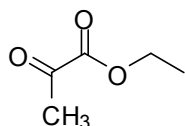


(357 mg, 1.0 mmol) wird in THF (7 ml) bei 0 °C gelöst. Folgend gibt man langsam Phenyltrimethylsilyllithium (568 mg, 4.0 mmol) gelöst in THF (3 ml) zu der gut gerührten Reaktionslösung und rührt für weitere 3 h. Anschließend titriert man die Reaktionslösung auf pH 2 und extrahiert mit Ethylacetat 3 mal (30 ml). Man erhält 149 mg (71%) **388** als rötlichen Feststoff.

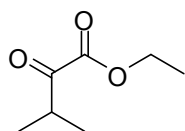
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3453, 3434, 3412, 3147, 3059, 3037, 2977, 2929, 1709, 1648, 1521, 1458, 1428, 1413, 1379, 1245, 1231, 1213, 1128, 1106, 742, 735.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 6.77 (s, 1H), 7.03 – 7.07 (m, 1H), 7.10 – 7.14 (m, 1H), 7.38 – 7.41 (m, 1H), 7.69 (d, J = 7.92 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 2.42 Hz, 1H), 8.71 (s br, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 103.6, 109.7, 111.7, 118.1, 119.4, 121.6, 126.4, 127.2, 135.6, 138.0, 166.4.
MS (EI)	m/z 203 (M^+), 175, 157, 130, 102, 77, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_1\text{O}_3$ (M^+) 203.0582; gef. 203.0587.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der α -Oxo-säureester (389 - 399)

Zu einer gut gerührten Lösung einer α -Oxosäure (1.0 mmol) in Methanol (20.0 ml), wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) Trimethylsilylchlorid (2.35 mmol) zugetropft. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wird das Methanol unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat) aufgereinigt.

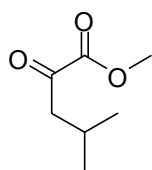
2-Oxo-propionsäure-1-ethylester (389). 2-Oxo-propionsäure **367** (880 mg, 10.0 mmol),

TMSCl (2.97 ml, 23.5 mmol), Ethanol (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 858 mg (74%) **389** als farbloses Öl.

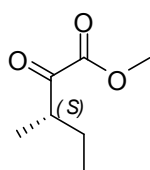
DC $R_f = 0.36$ (*n*-Hexan/EtOAc = 5:1).**IR** ν_{\max} (cm^{-1}) 2985, 2941, 2909, 2877, 1780, 1731, 1659, 1467, 1448, 1375, 1269, 1206, 1175, 1159, 1113, 1095, 1056, 1018. **$^1\text{H-NMR}$** δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.25 (t, $J = 7.07$ Hz, 3H), 2.36 (s, 3H), 4.19 (q, $J = 7.07$ Hz, 2H). **$^{13}\text{C-NMR}$** δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 13.8, 26.6, 61.7, 160.4, 191.8.**MS (EI)** m/z 116 (M^+), 103, 85, 73, 69, 61, 57, 51.**HRMS (EI)** m/z ber. für $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ (M^+) 116.0473; gef. 116.0473.**3-Methyl-2-oxo-buttersäure-1-ethylester (390).** 3-Methyl-2-oxo-buttersäure **368** (1160 mg,

10.0 mmol), TMSCl (2.97 ml, 23.5 mmol), Ethanol (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 7:1). Man erhält 1138 mg (79%) **390** als farbloses Öl.

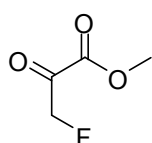
DC $R_f = 0.35$ (*n*-Hexan/EtOAc = 7:1).**IR** ν_{\max} (cm^{-1}) 2978, 2939, 2911, 2878, 1728, 1467, 1448, 1387, 1371, 1268, 1176, 1113, 1096, 1039. **$^1\text{H-NMR}$** δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.05 (d, $J = 7.07$ Hz, 6H), 1.26 (t, $J = 7.07$ Hz, 3H), 3.15 – 3.22 (m, 1H), 4.24 (q, $J = 7.07$ Hz, 2H). **$^{13}\text{C-NMR}$** δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 13.8, 17.0, 36.4, 61.8, 161.3, 197.9.**MS (CI)** m/z 144 (M^+), 129, 100, 89, 71, 59, 55.**HRMS (CI)** m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$ (M^+) 144.0786; gef. 144.0786.

4-Methyl-2-oxo-valeriansäure-1-methylester (391). 4-Methyl-2-oxo-valeriansäure **369**

(1440 mg, 10.0 mmol), TMSCl (2.97 ml, 23.5 mmol), Methanol (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 8:1). Man erhält 1166 mg (81%) **391** als farbloses Öl.

DC $R_f = 0.30$ (*n*-Hexan/EtOAc = 8:1).**IR**
 ν_{\max} (cm^{-1}) 2957, 2874, 2836, 1756, 1746, 1464, 1438, 1387, 1368, 1342, 1310, 1265, 1228, 1216, 1152, 1140, 1075, 1056, 1014.
 $^1\text{H-NMR}$
 δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.88 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.96 – 2.08 (m, 1H), 2.70 (d, $J = 6.72$ Hz, 2H), 3.75 (s, 3H).
 $^{13}\text{C-NMR}$
 δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.1, 23.4, 47.1, 52.5, 161.2, 193.5.
MS (EI)
 m/z 144 (M^+), 131, 117, 111, 102, 85, 69, 57, 43.
HRMS (EI)
 m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$ (M^+) 144.0786; gef. 144.0785.
3-Methyl-2-oxo-valeriansäure-1-methylester (392). 3-Methyl-2-oxo-valeriansäure **370**

(1440 mg, 10.0 mmol), TMSCl (2.97 ml, 23.5 mmol), Methanol (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 8:1). Man erhält 1022 mg (71%) **392** als farbloses Öl.

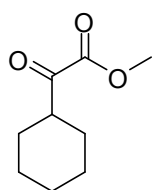
DC $R_f = 0.35$ (*n*-Hexan/EtOAc = 8:1).**IR**
 ν_{\max} (cm^{-1}) 2958, 2876, 2836, 1756, 1464, 1438, 1387, 1310, 1265, 1228, 1216, 1152, 1140, 1056.
 $^1\text{H-NMR}$
 δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.83 (t, $J = 7.46$ Hz, 3H), 1.03 (d, $J = 6.98$ Hz, 3H), 1.32 – 1.39 (m, 1H), 1.61 – 1.68 (m, 1H), 3.03 – 3.12 (m, 1H), 3.78 (s, 3H).
 $^{13}\text{C-NMR}$
 δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 11.0, 14.3, 24.3, 42.8, 52.7, 161.8, 197.5.
MS (EI)
 m/z 144 (M^+), 127, 101, 85, 69, 57.
HRMS (EI)
 m/z ber. für $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$ (M^+) 144.0786; gef. 144.0782.
3-Fluor-2-oxo-propionsäure-1-methylester (393). 3-Fluor-2-oxo-propionsäure **371** (1060

mg, 10.0 mmol), TMSCl (2.97 ml, 23.5 mmol), Methanol (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 672 mg (56%) **393** als gelbes Öl.

DC $R_f = 0.25$ (*n*-Hexan/EtOAc = 3:1).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3017, 2962, 2925, 2854, 1739, 1453, 1440, 1244, 1156, 1079, 1030, 967, 786.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.76, (s, 3H), 5.42 (s, 1H), 5.53 (s, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 52.6, 83.7, 83.9, 85.5, 85.7, 160.4, 160.5, 190.0, 190.1.
MS (EI)	m/z 120 (M ⁺), 107, 91, 79, 61, 59, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₄ H ₅ F ₁ O ₃ (M ⁺) ⁺ 120.0222; gef. 120.0227.

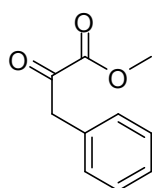
Cyclohexyl-2-oxo-essigsäure-1-methylester (394). Cyclohexyl-2-oxo-essigsäure **372**



(1560 mg, 10.0 mmol), TMSCl (2.97 ml, 23.5 mmol), Methanol (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 8:1). Man erhält 1496 mg (88%) **394** als farbloses Öl.

DC	R_f = 0.38 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 8:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2932, 2856, 1727, 1450, 1438, 1369, 1349, 1276, 1231, 1187, 1140, 1083, 1069, 1003.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.21 – 1.31 (m, 4H), 1.58 – 1.63 (m, 2H), 1.67 – 1.71 (m, 2H), 1.87 (d, J = 10.48 Hz, 2H), 2.94 – 3.01 (m, 1H), 3.77 (s, 3H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 24.7, 25.3, 27.1, 45.5, 52.6, 161.7, 196.8.
MS (EI)	m/z 170 (M ⁺), 155, 149, 137, 123, 111, 95, 83, 69, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₁₄ O ₃ (M ⁺) ⁺ 170.0943; gef. 170.0943.

2-Oxo-3-phenyl-propionsäure-1-methylester (395). 2-Oxo-3-phenyl-propionsäure **373**

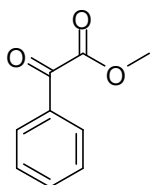


(3280 mg, 20.0 mmol), TMSCl (5.94 ml, 47.0 mmol), Methanol (400 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 1496 mg (83%) **395** als farbloses Öl.

DC	R_f = 0.31 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3091, 3065, 3033, 3010, 2956, 2930, 2893, 2841, 1737, 1619, 1604, 1585, 1497, 1454, 1439, 1393, 1276, 1206, 1158, 1084, 1061, 1026, 1003, 746, 700.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.79 (s, 3H), 6.42 (s, 1H), 7.32 – 7.36 (m, 3H), (d, J = 7.25 Hz, 2H).

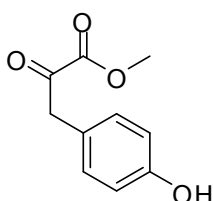
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 52.5, 110.7, 127.5, 128.4, 129.4, 134.6, 141.2, 165.1.
MS (EI)	m/z 178 (M^+), 165, 149, 133, 118, 105, 90, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (M^+) 178.0629; gef. 178.0623.

Oxo-phenyl-essigsäure-1-methylester (396). Oxo-phenyl-essigsäure **375** (3000 mg, 20.0 mmol), TMSCl (5.94 ml, 47.0 mmol), Methanol (400 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 3050 mg (93%) **396** als farbloses Öl.



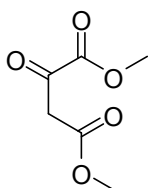
DC	R_f = 0.35 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3067, 3033, 3009, 2957, 2847, 1739, 1691, 1596, 1581, 1451, 1436, 1325, 1208, 1174, 1030, 1004, 687, 678.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.94 (s, 3H), 7.62 (t, J = 7.52 Hz, 2H), 7.78 (t, J = 7.39 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 6.58 Hz, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 53.0, 129.3, 129.8, 131.7, 135.5, 164.0, 186.5.
MS (EI)	m/z 164 (M^+), 151, 136, 121, 105, 77, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$ (M^+) 164.0476; gef. 164.0476.

3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-oxo-propionsäure-1-methylester (397). 3-(4-hydroxy-phenyl)-2-oxo-propionsäure **379** (3600 mg, 20.0 mmol), TMSCl (5.94 ml, 47.0 mmol), Methanol (400 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 2988 mg (77%) **397** als weißen Feststoff.



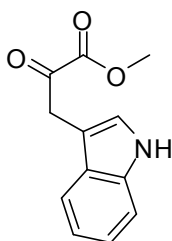
DC	R_f = 0.24 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3357, 3031, 2956, 2930, 2850, 2755, 2616, 1737, 1674, 1602, 1583, 1514, 1443, 1382, 1309, 1240, 1217, 1174, 1158, 1108, 1066, 861, 835.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.76 (s, 3H), 6.36 (s, 1H, Enol), 6.74 (d, J = 8.73 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.73 Hz, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 52.3, 111.6, 115.3, 125.7, 131.2, 138.7, 157.1, 165.4.
MS (EI)	m/z 194 (M^+), 182, 166, 134, 121, 107, 93, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ (M^+) 194.0579; gef. 194.0578.

Dimethyl-2-oxo-succinat (398). 2-Oxo-succinat **380** (1320 mg, 10.0 mmol), TMSCl (5.94 ml, 47.0 mmol), Methanol (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1360 mg (85%) **398** als farbloses Öl.



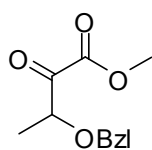
DC	$R_f = 0.28$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2956, 2925, 2853, 1738, 1690, 1600, 1454, 1438, 1362, 1261, 1201, 1169, 1049, 1019.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.63 (s, 3H, Keto), 3.71 (s, 3H, Enol), 3.77 (s, 3H, Enol), 3.79 (s, 3H, Keto), 3.90 (s, 2H, Keto), 5.82 (s, 1H, Enol).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 44.9 (Keto), 51.8 (Enol), 52.1 (Enol), 52.9 (Keto), 53.1 (Keto), 96.6 (Enol), 156.3 (Enol), 159.8 (Keto), 162.3 (Enol), 167.2 (Keto), 169.0 (Enol), 186.1 (Keto).
MS (EI)	m/z 160 (M ⁺), 129, 115, 101, 69, 59.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₆ H ₈ O ₅ (M ⁺) 160.0371; gef. 160.0370.

3-(1*H*-Indol-3-yl)-2-oxo-propionsäure (399). 2-Hydroxy-3-(1*H*-indol-3-yl)-propionsäure **388** (2050 mg, 10.0 mmol), TMSCl (2.97 ml, 23.5 mmol), Methanol (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1650 mg (76%) **399** als weißen Feststoff.



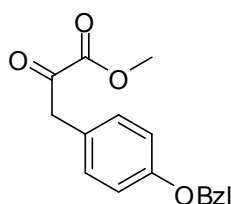
DC	$R_f = 0.28$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3398, 3079, 3058, 3000, 2951, 2926, 2854, 1689, 1657, 1580, 1527, 1490, 1458, 1432, 1384, 1351, 1337, 1255, 1231, 1151, 1129, 1105, 1066, 977, 743.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 3.79 (s, 3H), 6.82 (s, 1H), 7.06 (t, $J = 7.66$ Hz, 1H), 7.13 (t, $J = 7.66$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 8.06$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 7.52$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 2.69$ Hz, 1H), 8.97 (s, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 52.0, 104.9, 109.5, 111.7, 118.1, 119.5, 121.7, 126.4, 127.6, 135.6, 137.3, 165.1.
MS (EI)	m/z 217 (M ⁺), 186, 157, 129, 102, 77, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₂ H ₁₁ N ₁ O ₃ (M ⁺) 217.0738; gef. 217.0732.

3-(Benzyloxy)-2-oxo-buttersäure-1-methylester (400). Zu der 3-(Benzyloxy)-2-oxo-buttersäure **376** (625 mg, 3.0 mmol) in Methanol (109.8 ml), wird bei Raumtemperatur eine 2 M Lösung von TMSCHN₂ (18.0 mmol, 41.1 ml) in Hexan langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin werden die flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1) aufgereinigt. Man erhält 606 mg (91%) **400** als farbloses Öl.



DC	$R_f = 0.28$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 6:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3089, 3064, 3031, 2980, 2953, 2935, 2873, 1744, 1649, 1603, 1585, 1497, 1454, 1440, 1397, 1375, 1343, 1275, 1209, 1150, 1094, 1074, 1027, 1016, 741, 699.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.15 (d, $J = 6.31$ Hz, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.78 (m, 1H), 4.06 (d, $J = 3.63$ Hz, 2H), 7.22 – 7.27 (m, 3H), 7.29 – 7.36 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 15.3, 51.3, 70.1, 75.5, 127.3, 127.5, 128.1, 138.6, 172.8, 193.3.
MS (EI)	m/z 221 (M-H) ⁺ , 194, 189, 162, 145, 135, 118, 105, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₂ H ₁₃ O ₄ (M-H) ⁺ 221.0813; gef. 221.0819.

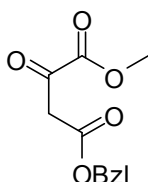
3-[4-(Benzyloxy)phenyl]-2-oxo-propionsäure-1-methylester (401). Zu einer gut gerührten Lösung von Dimethyldicarbonat (0.3 ml, 2.8 mmol) und 3-[(4-Benzyloxy)-phenyl]-2-oxo-propionsäure **377** (540 mg, 2.0 mmol) in THF (14.5 ml) wird in einer Portion Dimethylaminopyridin (25 mg, 0.2 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 4:1). Man erhält 375 mg (66%) **401** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.33$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 4:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3065, 3034, 3007, 2953, 2930, 2871, 1740, 1689, 1600, 1584, 1577, 1511, 1454, 1437, 1383, 1301, 1247, 1175, 1161, 1114, 1025, 833, 738, 697.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 1.52 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 6.26 (s, 1H), 6.95 (d, $J = 8.87$ Hz, 2H), 7.33 – 7.46 (m, 5H), 7.53 (d, $J = 15.85$ Hz, 2H).

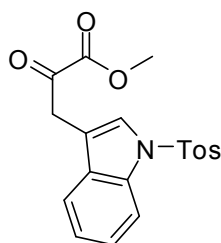
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 28.2, 70.0, 80.2, 115.1, 117.8, 127.5, 127.6, 128.1, 128.6, 129.5, 136.5, 143.1, 160.3, 166.7.
MS (EI)	m/z 284 (M^+), 256, 228, 212, 197, 181, 165, 152, 133, 121, 105, 91, 77, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 284.1048; gef. 284.1052.

4-Benzyl-1-methyl-2-oxo-succinat (402). Zu einer gut gerührten Lösung von Dimethyldicarbonat (0.45 ml, 4.2 mmol) und 4-Benzyl-2-oxo-succinat **378** (666 mg, 3.0 mmol) in THF (21.8 ml) wird in einer Portion Dimethylaminopyridin (38 mg, 0.3 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 4:1). Man erhält 375 mg (66%) **402** als gelblichen Feststoff.



DC	$R_f = 0.28$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 4:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3113, 3091, 3066, 3034, 3010, 2956, 2925, 2894, 1785, 1742, 1683, 1660, 1599, 1498, 1456, 1439, 1384, 1265, 1215, 1173, 1109, 1049, 1010, 754, 698.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 3.64 (s, 3H), 3.78 (d, $J = 7.39$ Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 7.20 – 7.23 (m, 3H), 7.31 (d, $J = 8.36$ Hz, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 45.0, 53.4, 65.9, 127.8, 128.1, 128.5, 135.7, 160.4, 166.8, 186.1.
MS (EI)	m/z 236 (M^+), 210, 192, 179, 168, 160, 150, 131, 121, 107, 91, 79, 71, 65, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ (M^+) ⁺ 236.0685; gef. 236.0684.

3-{1-[(4-Methylphenyl)sulfonyl]-1H-indol-3-yl}-2-oxo-propionsäure-1-methylester (403).



Zu einer gut gerührten Lösung von Dimethyldicarbonat (0.45 ml, 4.2 mmol) und 2-Oxo-propionsäure **387** (1071 mg, 3.0 mmol) in THF (21.8 ml) wird in einer Portion Dimethylaminopyridin (38 mg, 0.3 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 645 mg (58%) **403** als gelblichen Feststoff.

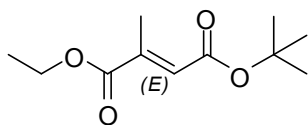
DC	$R_f = 0.32$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
-----------	--

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3349, 3210, 3179, 3137, 3108, 3068, 2952, 2926, 2878, 2589, 2100, 1719, 1634, 1597, 1522, 1487, 1459, 1431, 1369, 1312, 1261, 1248, 1190, 1176, 1140, 1119, 1097, 1082, 747, 728, 709, 683.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 2.34 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 6.46 (s, 1H), 7.10 – 7.18 (m, 2H), 7.33 (d, J = 8.06 Hz, 1H), 7.86 – 7.89 (m, 3H), 8.00 (d, J = 2.96 Hz, 1H), 8.32 – 8.37 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 21.1, 52.0, 106.3, 112.3, 118.4, 120.8, 122.5, 123.9, 125.5, 126.4, 127.9, 128.2, 129.6, 133.5, 135.7, 137.9, 145.3, 162.7.
MS (EI)	m/z 371 (M ⁺), 338, 278, 216, 188, 157, 144, 129, 123, 102, 91, 79, 69, 51.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₉ H ₁₇ N ₁ O ₅ S ₁ (M ⁺) ⁺ 371.0827; gef. 371.0828.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der (*E*)-Alkene (404 - 420)

Zu einer Lösung eines 2-Oxosäureesters (1.0 mmol) in THF (24.0 ml) wird bei 0 °C unter Schutzgasstrom langsam eine Lösung von *tert*-Butoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (2.0 mmol) in THF (16.0 ml) zugetropft (Spritzenpumpe 2ml/h). Nach vollständiger Zugabe wird die Reaktionslösung für weitere 5 h bei 0 °C gerührt und danach langsam auf Raumtemperatur gebracht und für weitere 10 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat) oder (*n*-Hexan/Diethylether).

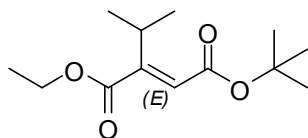
***trans*-[*E*]-2-Methyl-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-ethylester (404).** 2-Oxo-propionsäureethylester **389** (2324 mg, 20.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (15.06 g, 40.0 mmol), THF (800 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 20:1). Man erhält 4023 mg (94%) **404** als farbloses Öl.



DC	R_f = 0.24 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 20:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2984, 2954, 2907, 2874, 1731, 1718, 1647, 1436, 1387, 1368, 1354, 1257, 1204, 1112, 1036, 1024.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.23 (t, J = 7.12 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 2.13 (s, 3H), 4.17 (q, J = 7.12 Hz, 2H), 6.55 (s, 1H, <i>trans</i>).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 13.8, 13.9, 27.7, 61.3, 81.1, 127.7, 141.8, 164.5, 166.4.
MS (EI)	m/z 215 (M+H) ⁺ , 169, 141, 131, 113, 96, 85, 68, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{11}H_{19}O_4$ ($M+H$)⁺ 215.1288; gef. 215.1266.

***trans*-[*(E)*]-2-Isopropyl-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-ethylester (405).** 3-Methyl-2-oxo-buttersäureethylester **390** (1442 mg, 10.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethylen-triphenylphosphoran (7.53 g, 20.0 mmol), THF (400 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 2130 mg (88%) **405** als farbloses Öl.



DC R_f = 0.36 (*n*-Hexan/EtOAc = 10:1).

IR ν_{\max} (cm⁻¹) 2976, 2935, 2906, 2874, 1733, 1719, 1645, 1466, 1459, 1393, 1377, 1368, 1313, 1259, 1199, 1180, 1149, 1054, 1035.

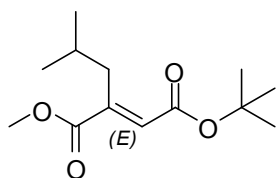
¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-*d*₆) 1.03 (d, J = 6.85 Hz, 6H), 1.21 (t, J = 7.12 Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 2.54 – 2.61 (m, 1H), 4.16 (q, J = 7.12 Hz, 2H), 5.75 (s, 1H, *trans*).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-*d*₆) 13.9, 20.5, 27.6, 32.2, 60.5, 80.6, 118.9, 154.6, 167.2, 167.9.

MS (EI) m/z 243 ($M+H$)⁺, 187, 169, 141, 127, 113, 99, 95, 81, 67, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{13}H_{23}O_4$ ($M+H$)⁺ 243.1596; gef. 243.1595.

***trans*-[*(E)*]-2-Isobutyl-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (406).** 4-Methyl-2-oxo-valeriansäure-1-methylester **391** (2880 mg, 20.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethylen-triphenylphosphoran (15.06 g, 40.0 mmol), THF (800 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 20:1). Man erhält 4308 mg (89%) **406** als farbloses Öl.



DC R_f = 0.34 (*n*-Hexan/EtOAc = 20:1).

IR ν_{\max} (cm⁻¹) 2958, 2932, 2872, 1739, 1719, 1646, 1467, 1457, 1392, 1368, 1340, 1272, 1258, 1220, 1203, 1150, 1092.

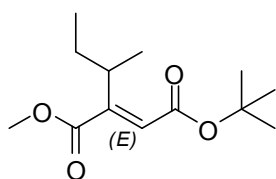
¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-*d*₆) 0.83 (d, J = 6.45 Hz, 6H), 1.44 (s, 9H), 1.71 – 1.78 (m, 1H), 2.58 (d, J = 7.25 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 6.58 (s, 1H, *trans*).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-*d*₆) 22.1, 27.6, 27.9, 35.2, 52.5, 81.2, 128.8, 144.2, 164.4, 167.1.

MS (EI) m/z 243 ($M+H$)⁺, 187, 169, 155, 137, 127, 109, 113, 99, 81, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{13}H_{23}O_4$ ($M+H$)⁺ 243.1596; gef. 243.1611.

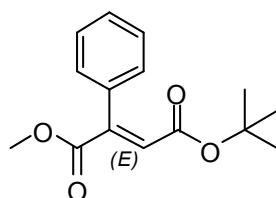
***trans*-[*(E)*]-2-*sec*-Butyl-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (407).** 3-Methyl-2-



oxo-valeriansäure-1-methylester **392** (1440 mg, 10.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (7.53 g, 20.0 mmol), THF (400 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 5:1). Man erhält 2130 mg (88%) **407** als farbloses Öl.

DC	$R_f = 0.40$ (<i>n</i> -Hexan/DEE = 5:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2971, 2934, 2878, 1737, 1718, 1644, 1479, 1457, 1434, 1384, 1368, 1339, 1322, 1267, 1216, 1203, 1149.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆) 0.82 (t, <i>J</i> = 7.39 Hz, 3H), 1.01 (d, <i>J</i> = 6.85 Hz, 3H), 1.23 – 1.36 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 2.33 – 2.39 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 6.28 (s, 1H, <i>trans</i>).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆) 11.4, 18.2, 27.1, 27.6, 39.4, 51.8, 80.7, 120.4, 153.2, 164.7, 166.6.
MS (EI)	<i>m/z</i> 243 (M+H) ⁺ , 215, 187, 169, 155, 141, 127, 109, 99, 81, 57.
HRMS (EI)	<i>m/z</i> ber. für C ₁₃ H ₂₃ O ₄ (M+H) ⁺ 243.1596; gef. 243.1603.

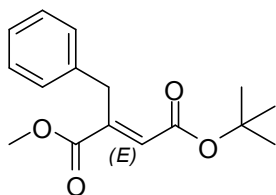
***trans*-[*(E)*]-2-Phenyl-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (408).** Oxo-phenyl-



essigsäure-1-methylester **396** (3280 mg, 20.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (15.06 g, 40.0 mmol), THF (800 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 4978 mg (95%) **408** als farbloses Öl.

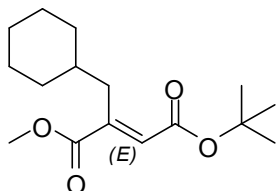
DC	$R_f = 0.26$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 10:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3061, 2978, 2951, 2931, 2851, 1738, 1711, 1624, 1577, 1497, 1449, 1422, 1393, 1368, 1356, 1293, 1249, 1208, 1146, 1035, 1019, 693, 689.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆) 1.17 (s, 9H), 3.71 (s, 3H), 6.88 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.18 – 7.21 (m, 2H), 7.36 – 7.38 (m, 3H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆) 27.2, 52.8, 81.4, 126.7, 127.7, 128.3, 128.8, 134.1, 140.8, 163.8, 164.2.
MS (EI)	<i>m/z</i> 262 (M ⁺) ⁺ , 230, 206, 191, 189, 175, 161, 147, 131, 115, 102, 91, 77, 57.
HRMS (EI)	<i>m/z</i> ber. für C ₁₅ H ₁₈ O ₄ (M ⁺) ⁺ 262.1205; gef. 262.1219.

***trans*-[*(E)*]-2-Benzyl-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (409).** 2-Oxo-3-phenyl-propionsäure-1-methylester **395** (3560 mg, 20.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (15.06 g, 40.0 mmol), THF (800 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 15:1). Man erhält 5078 mg (92%) **409** als farbloses Öl.

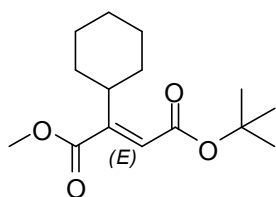


DC	$R_f = 0.22$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 15:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3087, 3063, 3030, 3004, 2979, 2952, 2933, 2849, 1733, 1718, 1649, 1496, 1454, 1435, 1393, 1368, 1271, 1205, 1150, 741, 701.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.44 (s, 9H), 3.66 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 6.71 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.16 – 7.18 (m, 3H), 7.25 – 7.28 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 27.6, 32.3, 52.5, 81.7, 126.3, 128.3, 128.4, 128.9, 137.9, 142.9, 164.4, 166.4.
MS (EI)	m/z 277 (M+H) ⁺ , 249, 220, 202, 188, 174, 160, 144, 131, 115, 91, 77, 65, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₂₁ O ₄ (M+H) ⁺ 277.1439; gef. 277.1447.

***trans*-[*(E)*]-2-(Cyclohexyl-methyl)-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (410).** 3-Cyclohexyl-2-oxo-propionsäure-1-methylester **385** (553 mg, 3.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (2.26 g, 6.0 mmol), THF (120 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 728 mg (86%) **410** als farbloses Öl.

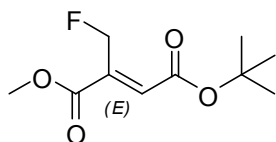


DC	$R_f = 0.38$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 10:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2978, 2925, 2852, 1738, 1719, 1646, 1479, 1449, 1435, 1392, 1367, 1326, 1273, 1251, 1206, 1150, 1138, 1103.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.80 – 0.91 (m, 3H), 1.07 – 1.24 (m, 5H), 1.39 (s, 9H), 1.60 – 1.67 (m, 3H), 2.16 (d, <i>J</i> = 7.25 Hz, 2H), 3.68 (s, 3H), 6.28 (s, 1H, <i>trans</i>).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 25.5, 25.8, 27.6, 32.2, 32.5, 37.4, 51.9, 80.7, 122.9, 146.7, 167.1, 168.6.
MS (EI)	m/z 283 (M+H) ⁺ , 255, 227, 209, 195, 144, 126, 112, 98, 83, 67, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₂₇ O ₄ (M+H) ⁺ 283.1909; gef. 283.1917.

trans-[(E)]-2-Cyclohexyl-butendisäure-4-tert-butylester-1-methylester (411).

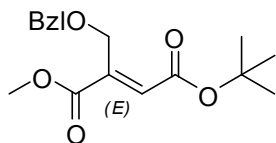
2-oxo-essigsäure-1-methylester **394** (510 mg, 3.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (2.26 g, 6.0 mmol), THF (120 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 5:1). Man erhält 740 mg (92%) **411** als farbloses Öl.

DC	$R_f = 0.32$ (<i>n</i> -Hexan/DEE = 5:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2978, 2931, 2855, 1737, 1717, 1642, 1479, 1451, 1433, 1392, 1380, 1368, 1324, 1265, 1203, 1150, 1107, 1013.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 1.14 – 1.23 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.64 – 1.70 (m, 2H), 1.75 – 1.83 (m, 4H), 2.22 – 2.27 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 6.66 (s, 1H, <i>trans</i>).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; CDCl ₃) 25.7, 26.1, 28.0, 31.1, 42.2, 52.0, 81.1, 119.6, 153.9, 167.8, 169.6.
MS (EI)	m/z 195 (M-CO(CH ₃) ₃) ⁺ , 181, 167, 149, 137, 121, 111, 94, 83, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₁ H ₁₅ O ₃ (M-CO(CH ₃) ₃) ⁺ 195.1021; gef. 195.1020.

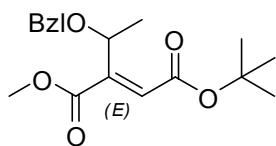
trans-[(E)]-2-(Fluor-methyl)-butendisäure-4-tert-butylester-1-methylester (412).

2-oxo-propionsäure-1-methylester **393** (720 mg, 6.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (4.52 g, 12.0 mmol), THF (240 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 628 mg (48%) **412** als farbloses Öl.

DC	$R_f = 0.23$ (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat = 10:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3004, 2980, 2956, 2932, 2873, 2855, 1722, 1657, 1456, 1438, 1394, 1369, 1339, 1284, 1260, 1211, 1153, 1035, 998, 969.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.42 (s, 9H), 3.72 (s, 3H), 5.07 (d, $J = 1.48$ Hz, 1H), 5.18 (d, $J = 1.48$ Hz, 1H), 6.43 (t, $J = 1.41$ Hz, 1H, <i>trans</i>).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 27.5, 52.3, 80.6, 81.7, 82.3, 127.8, 127.9, 137.6, 137.8, 163.6, 163.7, 164.9, 165.0.
MS (EI)	m/z 219 (M+H) ⁺ , 163, 147, 145, 143, 131, 117, 89, 63, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₀ H ₁₆ F ₁ O ₄ (M+H) ⁺ 219.1032; gef. 219.1044.

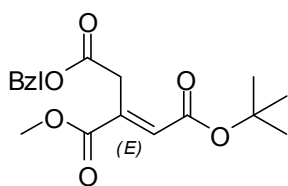
***trans*-[*(E)*]-2-[(Benzyloxy)methyl]-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (**413**). 3-**

(Benzyloxy)-2-oxo-propionsäure-1-methylester **382** (416 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (1.51 g, 4.0 mmol), THF (80 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 15:1). Man erhält 250 mg (41%) **413** als farbloses Öl.

DC $R_f = 0.31$ (*n*-Hexan/Ethylacetat = 15:1).**IR**
 ν_{\max} (cm⁻¹) 3085, 3062, 3029, 3002, 2953, 2924, 2870, 2854, 1712, 1638, 1496, 1456, 1450, 1392, 1367, 1328, 1314, 1283, 1257, 1207, 1151, 1117, 978, 768.
¹H-NMR
 δ_H (400 MHz; DMSO-*d*₆) 1.47 (s, 9H), 3.32 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 6.53 (s, 1H, *trans*), 7.36 – 7.42 (m, 5H).
¹³C-NMR
 δ_C (100 MHz; DMSO-*d*₆) 27.8, 51.2, 69.9, 72.8, 79.9, 124.9, 128.2, 128.9, 130.3, 143.6, 165.5, 167.0.
***trans*-[*(E)*]-2-[1-(Benzyloxy)ethyl]-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (**414**). 3-**

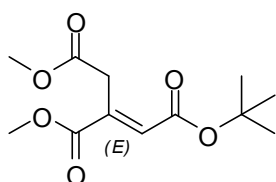
(Benzyloxy)-2-oxo-buttersäure-1-methylester **400** (1332 mg, 6.0 mmol), *tert*-Butoxy-carbonylmethylen-triphenylphosphoran (4.52 g, 12.0 mmol), THF (240 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 1170 mg (61%) **414** als farbloses Öl.

DC $R_f = 0.35$ (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1).**IR**
 ν_{\max} (cm⁻¹) 3090, 3065, 3032, 2979, 2952, 2932, 2873, 2857, 1732, 1656, 1497, 1455, 1437, 1392, 1368, 1326, 1274, 1200, 1149, 1063, 1027, 749, 698.
¹H-NMR
 δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.38 (d, *J* = 2.15 Hz, 3H), 1.43 (s, 9H), 3.81 (s, 3H), 4.16 – 4.21 (m, 1H), 4.40 (d, *J* = 11.82 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 11.82 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H, *trans*), 7.26 – 7.38 (m, 5H).
¹³C-NMR
 δ_C (100 MHz; CDCl₃) 20.8, 28.0, 52.2, 71.0, 75.2, 80.8, 127.0, 127.7, 128.0, 128.4, 137.8, 140.1, 167.6, 170.0.
MS (EI)
 m/z 247 (M-CO(CH₃)₃)⁺, 234, 196, 179, 158, 140, 126, 107, 91, 77, 65, 57.
HRMS (EI)
 m/z ber. für C₁₄H₁₅O₄ (M-CO(CH₃)₃)⁺ 247.0970; gef. 247.0972.

trans-[(E)]-3-Benzyl-1-tert-butyl-2-methyl-propen-1,2,3-tricarboxylat (415).

4-Benzyl-1-methyl-2-oxo-succinat **402** (1416 mg, 6.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (4.52 g, 12.0 mmol), THF (240 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 1422 mg (71%) **415** als farbloses Öl.

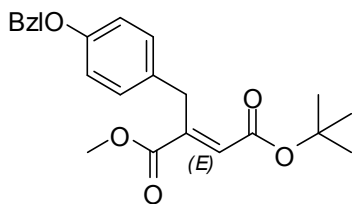
DC	$R_f = 0.26$ (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat = 6:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3089, 3065, 3032, 2954, 2929, 2856, 1739, 1663, 1497, 1488, 1455, 1437, 1368, 1350, 1257, 1213, 1197, 1168, 1105, 1081, 1022, 860, 698.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 1.46 (s, 9H), 3.74 (s, 3H), 3.97 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.95 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.32 – 7.37 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; CDCl ₃) 28.0, 34.4, 52.7, 66.6, 81.3, 128.4, 128.5, 128.6, 131.5, 137.9, 140.8, 166.6, 166.7, 169.8.
MS (EI)	m/z 303 (M-OCH ₃) ⁺ , 289, 257, 231, 199, 181, 153, 111, 91, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₇ H ₁₉ O ₅ (M-OCH ₃) ⁺ 303.1232; gef. 303.1233.

trans-[(E)]-1-tert-Butyl-2,3-dimethyl-propen-1,2,3-tricarboxylat (416).

Dimethyl-2-oxo-succinat **398** (960 mg, 6.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (4.52 g, 12.0 mmol), THF (240 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 1470 mg (95%) **416** als farbloses Öl.

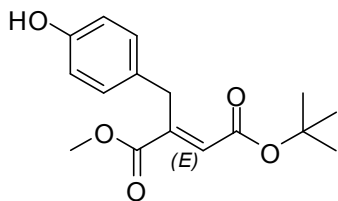
DC	$R_f = 0.24$ (<i>n</i> -Hexan/Ethylacetat = 6:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2980, 2955, 2935, 2850, 1724, 1653, 1456, 1436, 1369, 1327, 1280, 1257, 1197, 1151, 1094, 1021.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 1.46 (s, 9H), 3.84 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.09 – 4.14 (m, 2H), 6.87 (s, 1H, <i>trans</i>).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; CDCl ₃) 28.0, 34.3, 60.9, 61.7, 81.1, 128.6, 140.5, 166.1, 166.2, 170.0.
MS (EI)	m/z 258 (M') ⁺ , 227, 202, 185, 171, 153, 139, 126, 111, 98, 68, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₂ H ₁₈ O ₆ (M') ⁺ 258.1103; gef. 258.1102.

***trans*-[*(E)*]-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-[4-(benzyloxy)benzyl]-butendisäure (417).** 3-[4-(Benzyloxy)phenyl]-2-oxo-propionsäure-1-methylester **401** (568 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran (1.51 g, 4.0 mmol), THF (80 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/ Ethylacetat = 6:1). Man erhält 313 mg (41%) **417** als weißen Feststoff.



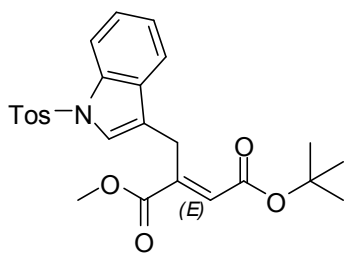
DC	$R_f = 0.31$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 6:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3065, 3032, 3004, 2980, 2954, 2929, 2849, 1733, 1718, 1649, 1496, 1454, 1435, 1393, 1368, 1271, 1205, 1150, 980, 833.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.44 (s, 9H), 3.68 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 5.58 (s, 1H, <i>trans</i>), 6.92 (d, $J = 8.60$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J = 8.60$ Hz, 2H), 7.31 – 7.44 (m, 5H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 28.0, 39.2, 52.1, 70.0, 81.4, 115.1, 127.4, 127.5, 129.9, 128.6, 128.6, 130.3, 130.4, 130.9, 136.9, 147.0, 157.9, 166.1, 169.0.

***trans*-[*(E)*]-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-(4-hydroxybenzyl)-butendisäure (418).** 3-(4-hydroxyphenyl)-2-oxo-propionsäure-1-methylester **397** (970 mg, 5.0 mmol), *tert*-Butoxy-carbonylmethylen-triphenylphosphoran (3.77 g, 10.0 mmol), THF (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 995 mg (68%) **418** als farbloses Öl.



DC	$R_f = 0.31$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3398, 3065, 3004, 2979, 2953, 2933, 2852, 1890, 1712, 1634, 1606, 1514, 1438, 1393, 1368, 1270, 1214, 1149, 1104, 984, 833.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.45 (s, 9H), 3.65 (s, 3H), 3.89 (s, 2H), 6.28 (s, 1H, <i>trans</i>), 6.61 – 6.65 (m, 2H), 6.69 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.9, 38.4, 51.8, 80.8, 115.2, 115.3, 128.0, 129.4, 130.1, 132.1, 147.6, 155.8, 166.6, 168.1.
MS (EI)	m/z 293 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 265, 251, 237, 218, 205, 190, 176, 160, 147, 131, 121, 110, 93, 77, 65, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 293.1388; gef. 293.1392.

***trans*-[(*E*)]-4-*tert*-1-Methyl-2-({1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1*H*-indol-3-yl}methyl)buten-**
disäure (419).



3-{1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1*H*-indol-3-yl}-2-oxo-propionsäure-1-methylester **403** (1855 mg, 5.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (3.77 g, 10.0 mmol), THF (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 962 mg (41%) **419** als gelben Feststoff.

DC

$R_f = 0.35$ (*n*-Hexan/EtOAc = 3:1).

IR

ν_{\max} (cm^{-1}) 3135, 3059, 2951, 2925, 2856, 1717, 1632, 1597, 1582, 1523, 1493, 1460, 1428, 1368, 1326, 1313, 1260, 1245, 1137, 1114, 1097, 1082, 972, 887, 813, 759, 744, 726, 708, 690.

 $^1\text{H-NMR}$

δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.35 (s, 9H), 1.98 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 4.01 – 4.10 (m, 2H), 6.51 (s, 1H, *trans*), 6.98 (t, $J = 7.52$ Hz, 2H), 7.08 (t, $J = 7.52$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 2.42$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 7.25$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 7.25$ Hz, 2H).

 $^{13}\text{C-NMR}$

δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 20.8, 27.5, 52.9, 59.8, 80.8, 111.6, 118.2, 118.7, 121.2, 121.7, 123.5, 124.3, 126.7, 128.1, 134.3, 134.7, 136.2, 138.9, 147.7, 168.5, 170.3.

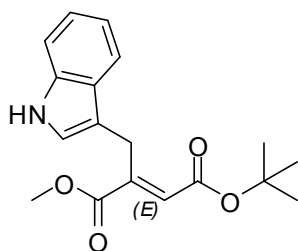
MS (EI)

m/z 413 $[(\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3]^+$, 380, 371, 340, 315, 287, 268, 259, 241, 227, 216, 199, 188, 170, 160, 154, 144, 129, 102, 91, 77, 65, 57.

HRMS (EI)

m/z ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_1\text{S}_1$ 413 $[(\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3]^+$ 413.0933; gef. 413.0931.

***trans*-[(*E*)]-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-(1*H*-indol-3-yl-methyl-butendisäure (420).**



3-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-propionsäure **399** (1085 mg, 5.0 mmol), *tert*-Butoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (3.77 g, 10.0 mmol), THF (200 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 1120 mg (71%) **420** als rötlichen Feststoff.

DC

$R_f = 0.38$ (*n*-Hexan/EtOAc = 2:1).

IR

ν_{\max} (cm^{-1}) 3402, 3118, 3058, 3002, 2978, 2951, 2931, 2854, 1713, 1648, 1620, 1554, 1490, 1478, 1457, 1435, 1393, 1368, 1353, 1314, 1277, 1257, 1209, 1151, 1127, 1094, 990, 973, 838, 743.

 $^1\text{H-NMR}$

δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.35 (s, 9H), 3.32 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 6.56 (s, 1H, *trans*), 6.97 – 7.00 (m, 1H), 7.06 – 7.10 (m, 1H), 7.19 (d, $J =$

2.42 Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.06$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 7.79$, 1H), 10.98 (s, 1H).

^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.5, 29.3, 51.9, 80.8, 108.2, 111.6, 118.7, 121.2, 121.7, 124.3, 126.7, 133.9, 136.2, 138.2, 163.9, 168.5.

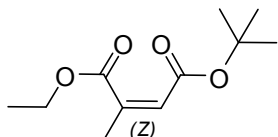
MS (EI) m/z 315 (M^+), 259, 241, 213, 199, 182, 154, 130, 103, 77, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}_1$ (M^+) 315.1470; gef. 315.1467.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der (Z)-Alkene (421 - 435)

Zu einer Suspension von Natriumhydrid [1.0 mmol, (60% in Paraffin)] in THF (2 ml), wird langsam bei 0 °C unter Schutzgasstrom (Argon) eine Lösung von *tert*-Butyl-*P,P*-dimethylphosphonoacetat (1.0 mmol) in THF (2 ml) zugetropft (Spritzenpumpe, 1 ml/h). Nach 30 min wird ein 2-Oxosäureester (1.0 mmol) in THF (4 ml) zugetropft (Spritzenpumpe, 2 ml/h) und für weitere 3 h gerührt. Der Überschuss an Natriumhydrid wird mit Wasser (0.4 ml) hydrolysiert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck azeotrop mittels Methanol entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat) oder (*n*-Hexan/Diethylether).

***cis*-[(Z)]-2-Methyl-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-ethylester (421).** 2-Oxo-propionsäureethylester **389** (465 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethylphosphonoacetat (897 mg, 4.0 mmol), Natriumhydrid (155 mg, 4.0 mmol) THF (32 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 548 mg (64%) **421** als gelbliches Öl.



DC $R_f = 0.26$ (*n*-Hexan/EtOAc = 10:1).

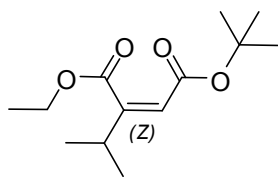
IR ν_{max} (cm^{-1}) 2981, 2934, 2875, 1729, 1718, 1652, 1446, 1393, 1369, 1351, 1276, 1219, 1201, 1150, 1126, 1043, 1029, 1018.

^1H -NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.20 (t, $J = 7.12$ Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.93 (d, $J = 1.61$ Hz, 3H), 4.15 (q, $J = 7.12$ Hz, 2H), 5.92 (d, $J = 1.61$ Hz, 1H, *cis*).

^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 13.7, 19.7, 27.6, 60.6, 80.6, 127.6, 143.5, 163.7, 168.2.

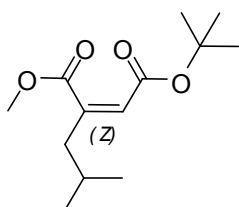
MS (EI) m/z 214 (M^+), 159, 141, 113, 96, 85, 69, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (M^+) 214.1205; gef. 214.1206.

cis-[(Z)]-2-Isopropyl-butendisäure-4-tert-butylester-1-ethylester (422).

3-Methyl-2-oxobuttersäureethylester **390** (576 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (897 mg, 4.0 mmol), Natriumhydrid (155 mg, 4.0 mmol) THF (32 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 7:1). Man erhält 658 mg (68%) **422** als gelbliches Öl.

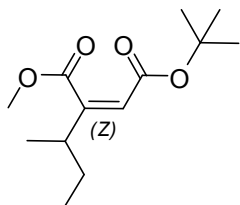
DC	$R_f = 0.39$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 7:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2976, 2935, 2906, 2874, 1733, 1719, 1645, 1466, 1459, 1393, 1377, 1368, 1313, 1259, 1199, 1180, 1149, 1054, 1035.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.03 (d, $J = 6.85$ Hz, 6H), 1.21 (t, $J = 7.12$ Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 2.56 – 2.61 (m, 1H), 4.17 (q, $J = 7.12$ Hz, 2H), 5.75 (d, $J = 1.34$ Hz, 1H, <i>cis</i>).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 13.8, 20.5, 27.6, 32.2, 60.5, 80.6, 118.9, 154.6, 163.9, 167.9.
MS (EI)	m/z 187 (M-CCH ₃) ⁺ , 187, 169, 141, 127, 113, 95, 87, 67, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₁₅ O ₄ (M-CCH ₃) ⁺ 187.0970; gef. 187.0970.

cis-[(Z)]-2-Isobutyl-butendisäure-4-tert-butylester-1-methylester (423).

4-Methyl-2-oxovaleriansäure-1-methylester **391** (576 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (897 mg, 4.0 mmol), Natriumhydrid (155 mg, 4.0 mmol) THF (32 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 5:1). Man erhält 590 mg (61%) **423** als gelbliches Öl.

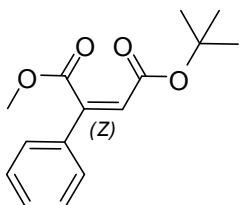
DC	$R_f = 0.24$ (<i>n</i> -Hexan/DEE = 5:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2958, 2933, 2872, 1738, 1719, 1646, 1467, 1456, 1435, 1392, 1368, 1339, 1273, 1221, 1203, 1150, 1092.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.85 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.39 (s, 9H), 1.64 – 1.72 (m, 1H), 2.15 (d, $J = 8.60$ Hz, 2H), 3.68 (s, 3H), 5.86 (t, $J = 1.28$ Hz, 1H, <i>cis</i>).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 21.9, 26.0, 27.6, 42.7, 51.9, 80.7, 122.8, 147.1, 163.7, 168.5.
MS (EI)	m/z 243 (M+H) ⁺ , 187, 169, 155, 137, 127, 109, 113, 99, 81, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₃ H ₂₃ O ₄ (M+H) ⁺ 243.1596; gef. 243.1611.

cis-[(Z)]-2-sec-Butyl-butendisäure-4-tert-butylester-1-methylester (424). 3-Methyl-2-oxo-valeriansäure-1-methylester **392** (969 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (897 mg, 4.0 mmol), Natriumhydrid (155 mg, 4.0 mmol) THF (32 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 5:1). Man erhält 745 mg (77%) **424** als gelbliches Öl.



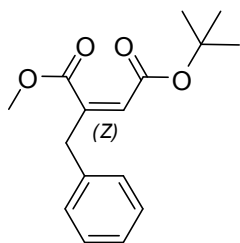
DC	$R_f = 0.26$ (<i>n</i> -Hexan/DEE = 5:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2971, 2934, 2878, 1737, 1718, 1644, 1479, 1457, 1434, 1384, 1368, 1339, 1322, 1267, 1216, 1203, 1149.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.82 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 1.28 – 1.37 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 2.32 – 2.41 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 5.78 (d, $J = 0.94$ Hz, 1H, <i>cis</i>).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 11.3, 18.2, 27.0, 27.6, 40.0, 51.8, 80.6, 120.4, 153.2, 163.8, 168.2.
MS (EI)	m/z 187 (M-C(CH ₃) ₃) ⁺ , 169, 155, 141, 127, 109, 99, 81, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₉ H ₁₅ O ₄ (M-C(CH ₃) ₃) ⁺ 187.0970; gef. 187.0978.

cis-[(Z)]-2-Phenyl-butendisäure-4-tert-butylester-1-methylester (425). Oxo-phenyl-essigsäure-1-methylester **396** (656 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (897 mg, 4.0 mmol), Natriumhydrid (155 mg, 4.0 mmol) THF (32 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 776 mg (74%) **425** als gelbliches Öl.



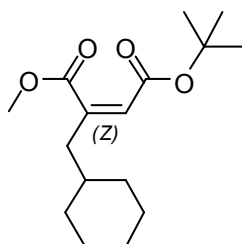
DC	$R_f = 0.38$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 10:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3062, 3003, 2979, 2953, 2934, 2848, 1739, 1711, 1624, 1597, 1578, 1497, 1478, 1450, 1434, 1368, 1357, 1294, 1249, 1208, 1148, 1019, 1003, 693, 688.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.44 (s, 9H), 3.82 (s, 3H), 6.46 (s, 1H, <i>cis</i>), 7.42 – 7.47 (m, 3H), 7.50 – 7.53 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 27.6, 52.4, 81.1, 126.7, 129.1, 129.3, 129.8, 135.5, 146.5, 163.8, 167.8.
MS (EI)	m/z 262 (M) ⁺ , 234, 206, 191, 189, 175, 161, 147, 131, 115, 102, 91, 77, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₅ H ₁₈ O ₄ (M) ⁺ 262.1205; gef. 262.1210.

cis-[(Z)]-2-Benzyl-butendisäure-4-tert-butylester-1-methylester (426). 2-Oxo-3-phenyl-propionsäure-1-methylester **395** (712 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (897 mg, 4.0 mmol), Natriumhydrid (155 mg, 4.0 mmol) THF (32 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 6:1). Man erhält 872 mg (79%) **426** als gelbliches Öl.



DC	$R_f = 0.30$ (<i>n</i> -Hexan/DEE = 6:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3061, 3027, 3000, 2952, 2926, 2850, 1735, 1717, 1625, 1497, 1450, 1433, 1355, 1289, 1251, 1208, 1195, 1167, 1025, 1003, 772, 686.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.37 (s, 9H), 3.60 (s, 2H), 3.61 (s, 3H), 5.82 (t, $J = 1.48$ Hz, 1H, <i>cis</i>), 7.16 – 7.20 (m, 2H), 7.22 – 7.26 (m, 1H), 7.29 – 7.34 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.5, 36.2, 51.9, 80.9, 123.3, 126.9, 128.6, 129.1, 136.2, 146.5, 163.8, 167.9.
MS (EI)	m/z 277 ($\text{M}+\text{H}^+$), 249, 220, 202, 188, 174, 160, 144, 131, 115, 91, 77, 65, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 277.1439; gef. 277.1447.

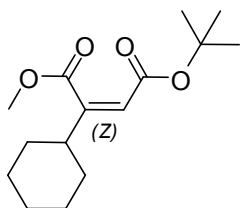
cis-[(Z)]-2-(Cyclohexyl-methyl)-butendisäure-4-tert-butylester-1-methylester (427). 3-Cyclohexyl-2-oxo-propionsäure-1-methylester **385** (368 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (449 mg, 2.0 mmol), Natriumhydrid (78 mg, 2.0 mmol) THF (16.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 10:1). Man erhält 457 mg (81%) **427** als gelbliches Öl.



DC	$R_f = 0.26$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 10:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 2978, 2931, 2855, 1737, 1717, 1642, 1479, 1451, 1433, 1392, 1380, 1368, 1324, 1265, 1203, 1150, 1107, 1013.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.83 – 0.88 (m, 2H), 1.12 – 1.23 (m, 5H), 1.39 (s, 9H), 1.57 – 1.67 (m, 4H), 2.16 (d, $J = 7.12$ Hz, 2H), 3.68 (s, 3H), 5.84 (t, $J = 1.14$ Hz, 1H, <i>cis</i>).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 25.5, 25.8, 27.6, 32.2, 32.5, 35.2, 51.9, 80.7, 122.9, 146.7, 163.7, 168.5.
MS (EI)	m/z 283 ($\text{M}+\text{H}^+$), 255, 227, 209, 195, 144, 126, 112, 98, 83, 67, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{16}H_{27}O_4$ ($M+H$)⁺ 283.1909; gef. 283.1917.

***cis*-[(*Z*)]-2-Cyclohexyl-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (428).** Cyclohexyl-2-



oxo-essigsäure-1-methylester **394** (340 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (449 mg, 2.0 mmol), Natriumhydrid (78 mg, 2.0 mmol) THF (16.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 5:1). Man erhält 450 mg (84%) **428** als gelbliches Öl.

DC R_f = 0.15 (*n*-Hexan/DEE = 5:1).

IR ν_{\max} (cm⁻¹) 2978, 2931, 2855, 1737, 1717, 1642, 1479, 1451, 1433, 1392, 1380, 1368, 1324, 1265, 1203, 1150, 1107, 1013.

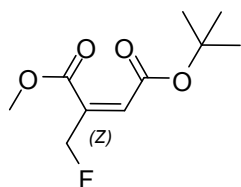
¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-*d*₆) 1.04 – 1.29 (m, 5H), 1.38 (s, 9H), 1.56 – 1.63 (m, 2H), 1.68 – 1.73 (m, 3H), 2.20 – 2.24 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 5.73 (d, J = 1.21 Hz, 1H, *cis*).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-*d*₆) 25.2, 25.5, 27.6, 30.6, 41.5, 51.7, 80.6, 119.3, 153.6, 164.0, 168.4.

MS (EI) m/z 195 ($M-CO(CH_3)_3$)⁺, 181, 167, 149, 137, 121, 111, 94, 83, 69, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{11}H_{15}O_3$ ($M-CO(CH_3)_3$)⁺ 195.1021; gef. 195.1020.

***cis*-[(*Z*)]-2-(Fluor-methyl)-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (429).** 3-Fluor-2-



oxo-propionsäure-1-methylester **393** (240 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (449 mg, 2.0 mmol), Natriumhydrid (78 mg, 2.0 mmol) THF (16.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 7:1). Man erhält 192 mg (44%) **429** als gelbliches Öl.

DC R_f = 0.32 (*n*-Hexan/Ethylacetat = 7:1).

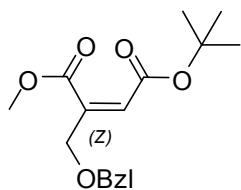
IR ν_{\max} (cm⁻¹) 2981, 2956, 2936, 2855, 1719, 1656, 1457, 1437, 1394, 1369, 1338, 1319, 1283, 1259, 1210, 1150, 1034, 997, 838.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.49 (s, 9H), 3.80 (s, 3H), 4.99 (d, J = 1.88 Hz, 1H), 5.11 (d, J = 1.88 Hz, 1H), 6.22 (q, J = 1.61 Hz, 1H, *cis*).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 27.9, 52.4, 80.0, 81.8, 82.3, 126.5, 126.6, 137.4, 137.5, 164.1, 164.2, 165.1, 165.2.

MS (EI) m/z 219 ($M+H$)⁺, 163, 147, 145, 143, 131, 117, 89, 63, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{10}H_{16}F_1O_4$ ($M+H$)⁺ 219.1032; gef. 219.1044.

cis-[(Z)]-2-[(Benzyloxy)methyl]-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (430).

(Benzyloxy)-2-oxo-propionsäure-1-methylester **382** (208 mg, 1.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (225 mg, 1.0 mmol), Natriumhydrid (39 mg, 1.0 mmol) THF (8.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 105 mg (34%) **430** als gelbliches Öl.

DC $R_f = 0.23$ (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1).**IR**

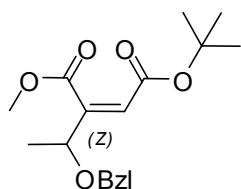
ν_{\max} (cm^{-1}) 3080, 3060, 3028, 3004, 2956, 2928, 2870, 2854, 1717, 1640, 1495, 1454, 1450, 1394, 1366, 1328, 1314, 1283, 1257, 1207, 1151, 1117, 978, 768.

 $^1\text{H-NMR}$

δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.53 (s, 9H), 3.81 (s, 3H), 4.38 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 7.34 – 7.41 (m, 3H), 7.48 – 7.53 (m, 2H), 6.34 (d, $J = 1.07$ Hz, 1H, *cis*).

 $^{13}\text{C-NMR}$

δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 28.2, 51.5, 70.5, 71.9, 80.5, 126.8, 127.9, 128.8, 129.9, 135.0, 145.4, 163.0, 166.3.

cis-[(Z)]-2-[1-(Benzyloxy)ethyl]-butendisäure-4-*tert*-butylester-1-methylester (431).

(Benzyloxy)-2-oxo-buttersäure-1-methylester **400** (222 mg, 1.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (225 mg, 1.0 mmol), Natriumhydrid (39 mg, 1.0 mmol) THF (8.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 131 mg (41%) **431** als gelbliches Öl.

DC $R_f = 0.24$ (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1).**IR**

ν_{\max} (cm^{-1}) 3090, 3065, 3032, 2979, 2952, 2932, 2873, 2857, 1732, 1656, 1497, 1455, 1437, 1392, 1368, 1326, 1274, 1200, 1149, 1063, 1027, 749, 698.

 $^1\text{H-NMR}$

δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 1.37 (s, 9H), 1.76 (d, $J = 7.12$ Hz, 3H), 3.64 (s, 3H), 4.05 – 4.18 (m, 1H), 4.42 (d, $J = 11.69$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 11.42$ Hz, 1H), 5.14 (s, 1H, *cis*), 7.30 – 7.37 (m, 5H).

 $^{13}\text{C-NMR}$

δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 18.4, 27.6, 51.6, 70.9, 76.1, 80.0, 126.7, 127.7, 128.2, 133.3, 140.0, 149.9, 162.8, 169.5.

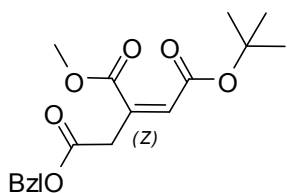
MS (EI)

m/z 247 ($\text{M-CO}(\text{CH}_3)_3^+$, 234, 196, 179, 158, 140, 126, 107, 91, 77, 65, 57.

HRMS (EI)

m/z ber. für $C_{14}H_{15}O_4$ ($M-CO(CH_3)_3$)⁺ 247.0970; gef. 247.0972.

***cis*-[*(Z)*]-3-Benzyl-1-*tert*-butyl-2-methyl-propen-1,2,3-tricarboxylat (432).**



4-Benzyl-1-methyl-2-oxo-succinat **402** (472 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (449 mg, 2.0 mmol), Natriumhydrid (78 mg, 2.0 mmol) THF (16.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 320 mg (48%) **432** als gelbliches Öl.

DC

R_f = 0.20 (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1).

IR

ν_{\max} (cm⁻¹) 3089, 3065, 3032, 2954, 2929, 2856, 1739, 1663, 1497, 1488, 1455, 1437, 1368, 1350, 1257, 1213, 1197, 1168, 1105, 1081, 1022, 860, 698.

¹H-NMR

δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.41 (s, 9H), 3.80 (s, 3H), 3.89 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 6.88 (s, 1H, *cis*), 7.32 – 7.36 (m, 5H).

¹³C-NMR

δ_C (100 MHz; CDCl₃) 27.9, 42.2, 52.5, 70.3, 81.1, 118.5, 128.6, 129.1, 131.0, 138.5, 140.5, 164.6, 166.2, 169.9.

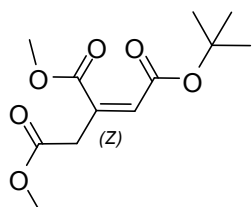
MS (EI)

m/z 303 ($M-OCH_3$)⁺, 289, 257, 231, 199, 181, 153, 111, 91, 69, 57.

HRMS (EI)

m/z ber. für $C_{17}H_{19}O_5$ ($M-OCH_3$)⁺ 303.1232; gef. 303.1233.

***cis*-[*(Z)*]-1-*tert*-Butyl-2,3-dimethyl-propen-1,2,3-tricarboxylat (433).**



Dimethyl-2-oxo-succinat **398** (320 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (449 mg, 2.0 mmol), Natriumhydrid (78 mg, 2.0 mmol) THF (16.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 258 mg (50%) **433** als gelbliches Öl.

DC

R_f = 0.31 (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1).

IR

ν_{\max} (cm⁻¹) 2980, 2955, 2935, 2850, 1724, 1653, 1456, 1436, 1369, 1327, 1280, 1257, 1197, 1151, 1094, 1021.

¹H-NMR

δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.47 (s, 9H), 3.68 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.90 (s, 2H), 6.89 (s, 1H, *cis*).

¹³C-NMR

δ_C (100 MHz; CDCl₃) 28.0, 34.3, 51.9, 52.1, 81.3, 128.4, 137.9, 164.5, 166.7, 170.4.

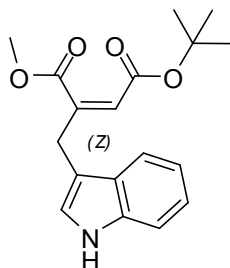
MS (EI)

m/z 259 ($M+H$)⁺, 241, 203, 185, 153, 126, 99, 75.

HRMS (EI)

m/z ber. für $C_{12}H_{19}O_6$ ($M+H$)⁺ 259.1181; gef. 259.1172.

***cis*-[(Z)]-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-(1*H*-indol-3-yl-methyl-butendisäure (434).** 3-(1*H*-indol-3-yl)-2-oxo-propionsäure **399** (434 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (449 mg, 2.0 mmol), Natriumhydrid (78 mg, 2.0 mmol) THF (16.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 233 mg (37%) **434** als rötlichen Feststoff.



DC

R_f = 0.22 (*n*-Hexan/EtOAc = 2:1).

IR

ν_{max} (cm⁻¹) 3402, 3058, 2979, 2952, 2932, 2851, 1712, 1649, 1620, 1554, 1490, 1458, 1435, 1393, 1368, 1352, 1315, 1279, 1258, 1230, 1212, 1152, 1128, 1099, 975, 744.

¹H-NMR

δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 1.35 (s, 9H), 3.64 (s, 3H), 3.99 – 4.10 (m, 2H), 5.69 (s, 1H, *cis*), 6.96 – 7.00 (m, 1H), 7.06 – 7.09 (m, 1H), 7.19 (d, *J* = 2.42 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.19 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.39, 1H), 8.98 (s, 1H).

¹³C-NMR

δ_C (100 MHz; DMSO-d₆) 27.5, 29.3, 51.9, 78.7, 111.6, 111.7, 118.2, 118.7, 121.2, 121.7, 126.7, 127.1, 136.2, 141.6, 163.9, 168.5.

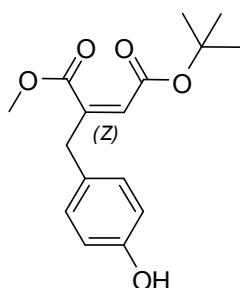
MS (EI)

m/z 315 (M⁺), 287, 259, 241, 227, 213, 199, 183, 170, 154, 144, 130, 117, 102, 89, 77, 57.

HRMS (EI)

m/z ber. für C₁₈H₂₁O₄N₁ (M⁺)⁺ 315.1470; gef. 315.1470.

***cis*-[(Z)]-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-(4-hydroxy)-butendisäure (435).** 3-(4-hydroxy-phenyl)-2-oxo-propionsäure-1-methylester **397** (388 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butyl-*P,P*-dimethyl-phosphonoacetat (449 mg, 2.0 mmol), Natriumhydrid (78 mg, 2.0 mmol) THF (16.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 175 mg (30%) **435** als weißen Feststoff.



DC

R_f = 0.21 (*n*-Hexan/EtOAc = 3:1).

IR

ν_{max} (cm⁻¹) 3365, 2980, 2954, 2931, 2851, 2823, 2748, 2016, 1894, 1712, 1690, 1648, 1602, 1583, 1514, 1444, 1393, 1369, 1284, 1215, 1171, 1156, 1103, 836.

¹H-NMR

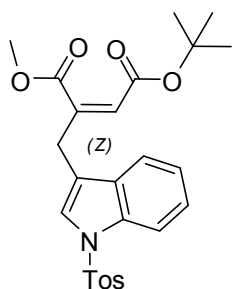
δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 1.37 (s, 9H), 3.61 (s, 2H), 3.62 (s, 3H), 6.54 (s, 1H, *cis*), 6.69 (d, *J* = 8.33 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.60 Hz, 2H), 6.96 (br s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.6, 38.4, 51.9, 80.9, 115.4, 115.7, 126.0, 128.5, 130.1, 132.1, 147.6, 156.3, 163.3, 168.1.
MS (EI)	m/z 293 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 265, 251, 237, 218, 205, 190, 176, 160, 147, 131, 121, 110, 93, 77, 65, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 293.1388; gef. 293.1392.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der (Z)-Alkene (436 - 437)

Zu einer Suspension von $\text{Sn}(\text{OSO}_2\text{CF}_3)_2$ (1.68 mmol) in DCM (11.5 ml), wird langsam bei Raumtemperatur unter Schutzgasstrom (Argon) eine Lösung von *tert*-Butyl-[bis(2,2,2-trifluoroethoxy)phosphono]acetat (1.4 mmol) in DCM (6.8 ml) zugetropft (Spritzenpumpe, 1 ml/h). Nach 5 min erfolgt die Zugabe von *N*-Ethylpiperidin (1.55 mmol) und man kühlt die Reaktionslösung auf 0 °C ab. Nach weiteren 2 h wird die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur gebracht und folgend auf 80 °C unter Rückfluss erwärmt. Unter Rückfluss wird der 2-Oxosäureester (1.0 mmol) in DCM (1.0 ml) zugetropft (Spritzenpumpe, 1 ml/h) und für weitere 20 h unter Rückfluss erwärmt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gebracht, in Wasser (12.0 ml) gegossen und dreimal mit Chloroform (50 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit *n*-Hexan (270 ml) versetzt und über eine kurze Kieselgelsäule (*n*-Hexan/ CHCl_3 = 2:1) filtriert. Das erhaltene Filtrat wird unter reduziertem Druck eingedunstet und folgend mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat) aufgereinigt.

cis-[(Z)]-4-*tert*-1-Methyl-2-({1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1H-indol-3-yl}methyl)butendi-



säure (436). 3-{1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1H-indol-3-yl}-2-oxopropionsäure-1-methylester **403** (371 mg, 1.0 mmol), $\text{Sn}(\text{OSO}_2\text{CF}_3)_2$ (700 mg, 1.7 mmol), *tert*-Butyl-[bis(2,2,2-trifluoroethoxy)phosphono]acetat (560 mg, 1.4 mmol), *N*-Ethylpiperidin (0.22 ml, 1.55 mmol), DCM (19.3 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 130 mg (35%) **436** als gelbliches Öl.

DC	R_f = 0.22 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3121, 3058, 2979, 2952, 2930, 2853, 1715, 1648, 1597, 1553, 1524, 1491, 1458, 1434, 1368, 1353, 1314, 1273, 1209, 1152, 1127, 1095, 973, 744, 726.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.35 (s, 9H), 1.98 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.99 – 4.10 (m, 2H), 5.69 (s, 1H, <i>cis</i>), 6.99 (t, J = 7.52 Hz, 2H), 7.08 (t, J =

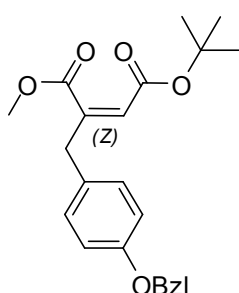
7.52 Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 2.42$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 8.06$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 7.79$ Hz, 2H).

^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 20.8, 27.5, 46.7, 51.9, 80.7, 111.6, 118.7, 119.9, 121.2, 121.7, 124.3, 125.5, 126.8, 127.9, 134.9, 135.3, 136.2, 138.4, 147.7, 163.9, 168.5.

MS (EI) m/z 413 $[(\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3)^+]$, 380, 371, 340, 315, 287, 268, 259, 241, 227, 216, 199, 188, 170, 160, 154, 144, 129, 102, 91, 77, 65, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_1\text{S}_1$ 413 $[(\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3)^+]$ 413.0933; gef. 413.0931.

***cis*-[(*Z*)]-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-[4-(benzyloxy)benzyl]-butendisäure (437).** 3-[4-



(Benzyloxy)phenyl]-2-oxo-propionsäure-1-methylester **401** (284 mg, 1.0 mmol), $\text{Sn}(\text{OSO}_2\text{CF}_3)_2$ (700 mg, 1.7 mmol), *tert*-Butyl-[bis(2,2,2-trifluoroethoxy)phosphono]acetat (560 mg, 1.4 mmol), *N*-Ethylpiperidin (0.22 ml, 1.55 mmol), DCM (19.3 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 134 mg (35%) **437** als gelbliches Öl.

DC $R_f = 0.23$ (*n*-Hexan/EtOAc = 6:1).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3065, 3032, 3004, 2980, 2954, 2929, 2849, 1733, 1718, 1649, 1496, 1454, 1435, 1393, 1368, 1271, 1205, 1150, 980, 833.

^1H -NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.37 (s, 9H), 3.48 (s, 2H), 3.61 (s, 3H), 4.00 – 4.08 (m, 2H), 6.54 (s, 1H, *cis*), 6.69 (d, $J = 8.33$ Hz, 2H), 6.91 – 6.97 (m, 5H), 7.27 (d, $J = 10.48$ Hz, 2H).

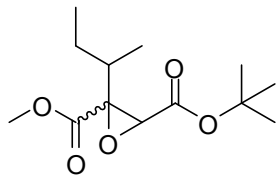
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.6, 32.0, 51.9, 69.8, 80.9, 115.6, 115.8, 122.5, 125.9, 126.0, 128.5, 130.1, 132.1, 136.6, 143.2, 156.3, 163.3, 168.1.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der Epoxide (441 - 453)

Zu einer Lösung von abs. *tert*-Butylhydroperoxid in Toluol^[393] (4.0 M, 0.375 ml, 1.5 mmol) und THF (2.4 ml) wird bei -78°C unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam eine Lösung von *tert*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.5 M, 0.733 ml, 1.1 mmol) zugetropft und für weitere 5 min gerührt. Danach erfolgt die Zugabe des Alkens (1.0 mmol) in THF (0.8 ml) und die Reaktionslösung wird langsam auf Raumtemperatur gebracht und für weitere 3 – 6 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) gibt man Na_2SO_3 (189 mg, 1.5 mmol) zu und rührt für 15 min. Anschließend wird die Reaktionslösung mit Diethylether (4.0 ml) verdünnt und über eine kurze Celite⁵⁰⁰-Säule abfiltriert. Man wäscht mit Diethylether (20.0 ml) nach

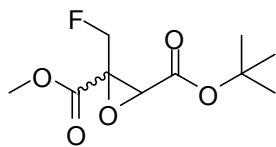
und entfernt die flüchtigen Komponenten des Filtrats unter reduziertem Druck. Die Reinigung erfolgt über eine Kieselgelsäule (Kieselgel; *n*-Hexan/Ethylacetat oder *n*-Hexan/Diethylether).

4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-*sec*-butyloxiran-2,3-dicarboxylat (441). (*E*)-Alken **407** (968 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 1.5 ml, 6.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 2.93 ml, 4.4 mmol), Na₂SO₃ (756 mg, 6.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 7:1). Man erhält 325 mg (63%) **441** als farbloses Öl.



DC	$R_f = 0.26$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 7:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2970, 2933, 2878, 1737, 1458, 1434, 1383, 1368, 1321, 1259, 1201, 1150.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆) 0.82 (t, <i>J</i> = 7.39 Hz, 3H), 1.01 (d, <i>J</i> = 6.85 Hz, 3H), 1.32 – 1.46 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 2.34 – 2.43 (m, 1H), 3.60 (s, 1H), 3.69 (s, 3H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆) 11.3, 18.2, 27.1, 27.6, 39.4, 51.7, 60.3, 67.5, 80.6, 163.8, 168.2.
MS (EI)	<i>m/z</i> 259 (M+H) ⁺ , 245, 227, 203, 187, 169, 157, 143, 129, 115, 101, 97, 71, 57.
HRMS (EI)	<i>m/z</i> ber. für C ₁₃ H ₂₃ O ₅ (M+H) ⁺ 259.1545; gef. 259.1559.

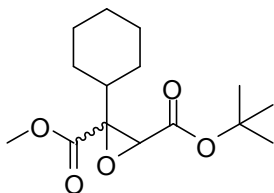
4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-(fluormethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat (442). (*E*)-Alken **412** (872 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 1.5 ml, 6.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 2.93 ml, 4.4 mmol), Na₂SO₃ (756 mg, 6.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 7:1). Man erhält 403 mg (43%) **442** als gelbes Öl.



DC	$R_f = 0.19$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 7:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2959, 2924, 2854, 1742, 1455, 1394, 1369, 1314, 1260, 1195, 1152, 1073, 1021, 963, 800.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 1.47 (s, 9H), 3.61 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.51 – 4.99 (m, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; CDCl ₃) 27.8, 53.0, 55.0, 55.1, 61.1, 61.3, 80.2, 82.0, 83.8, 164.1, 164.2, 165.4, 165.5.
MS (EI)	<i>m/z</i> 235 (M+H) ⁺ , 220, 205, 193, 179, 161, 133, 105, 91, 73, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{10}H_{16}O_5F_1$ ($M+H$)⁺ 235.0981; gef. 235.0983.

4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-cyclohexyl-oxiran-2,3-dicarboxylat (443). (*E*)-Alken **411** (536 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na_2SO_3 (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 301 mg (53%) **443** als farbloses Öl.



DC R_f = 0.30 (*n*-Hexan/EtOAc = 6:1).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 2978, 2931, 2855, 1737, 1717, 1479, 1451, 1433, 1392, 1368, 1293, 1265, 1203, 1150, 1107.

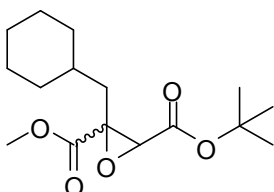
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.15 – 1.17 (m, 4H), 1.34 – 1.37 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.46 – 1.98 (m, 4H), 2.18 – 2.23 (m, 1H), 3.60 (s, 1H), 3.68 (s, 3H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 25.5, 26.2, 27.6, 28.9, 30.6, 41.5, 51.8, 66.5, 80.6, 86.7, 164.0, 168.5.

MS (EI) m/z 284 (M^+)⁺, 251, 213, 195, 181, 167, 152, 135, 125, 107, 93, 71, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{15}H_{24}O_5$ (M^+)⁺ 284.1623; gef. 284.1622.

4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-(cyclohexylmethyl)oxiran-2,3-dicarboxylat (444). (*E*)-Alken **410** (564 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na_2SO_3 (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 286 mg (48%) **444** als farbloses Öl.



DC R_f = 0.47 (*n*-Hexan/EtOAc = 6:1).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 2977, 2930, 2855, 1736, 1475, 1451, 1433, 1391, 1366, 1305, 1258, 1201, 1150, 1108, 1066.

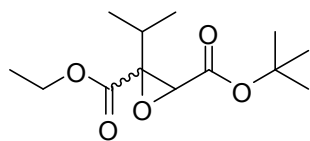
1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.10 – 1.22 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.50 – 1.62 (m, 2H), 1.65 – 1.89 (m, 4H), 1.92 – 2.02 (m, 1H), 2.16 – 2.28 (m, 2H), 3.64 (s, 1H), 3.68 (s, 3H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 25.5, 26.2, 27.6, 30.6, 35.7, 51.8, 64.6, 66.5, 86.7, 164.0, 168.5.

MS (EI) m/z 298 (M^+)⁺, 283, 268, 242, 225, 197, 171, 111, 97, 84, 72, 44.

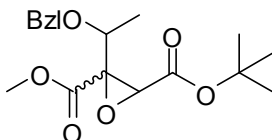
HRMS (EI) m/z ber. für $C_{16}H_{26}O_5$ (M^+)⁺, 298.1780; gef. 298.1783.

4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-isopropyl-oxiran-2,3-dicarboxylat (445). (*E*)-Alken **405** (484 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na₂SO₃ (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 212 mg (41%) **445** als farbloses Öl.



DC	$R_f = 0.32$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 6:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2979, 2934, 2876, 1733, 1457, 1393, 1369, 1305, 1282, 1258, 1220, 1156, 1094.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 0.90 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 1.17 (t, $J = 7.12$ Hz, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.92 – 1.99 (m, 1H), 3.63 (s, 1H), 4.06 (q, $J = 7.12$ Hz, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; CDCl ₃) 13.9, 14.1, 17.9, 27.7, 36.1, 59.6, 60.9, 66.9, 79.8, 167.1, 170.0.
MS (EI)	m/z 243 (M-OH) ⁺ , 231, 215, 203, 187, 169, 157, 141, 129, 112, 95, 83, 67, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₂ H ₂₀ O ₅ (M-OH) ⁺ 243.1232; gef. 243.1243.

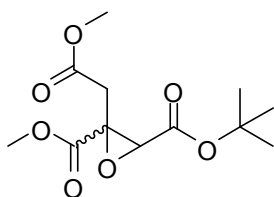
4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-[1-(benzyloxy)ethyl]oxiran-2,3-dicarboxylat (446). (*E*)-Alken **414** (640 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na₂SO₃ (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 222 mg (33%) **446** als gelbliches Öl.



DC	$R_f = 0.23$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3090, 3065, 3032, 2979, 2952, 2933, 2874, 1732, 1497, 1455, 1437, 1392, 1368, 1326, 1274, 1200, 1149, 1131, 1063, 1027, 749, 698.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 1.43 (s, 9H), 1.81 (d, $J = 7.12$ Hz, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.91 (s, 1H), 4.06 – 4.10 (m, 1H), 4.62 – 4.70 (m, 2H), 7.31 – 7.36 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; CDCl ₃) 14.5, 28.0, 51.8, 61.1, 71.6, 72.0, 84.3, 84.6, 127.9, 128.0, 128.4, 140.2, 170.0, 171.7.
MS (EI)	m/z 234 [M-CO ₂ C(CH ₃) ₃] ⁺ , 196, 179, 164, 158, 149, 140, 126, 107, 91, 77, 65, 57, 51.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{13}H_{14}O_4$ $[M-CO_2C(CH_3)_3]^+$ 234.0892; gef. 234.0899.

5-*tert*-Butyl-1-methyl-3,4-anhydro-2-deoxy-3-(methoxycarbonyl)pentarat (447). (*E*)-



Alken **416** (1032 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 1.5 ml, 6.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 2.93 ml, 4.4 mmol), Na_2SO_3 (756 mg, 6.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 230 mg (21%) **447** als farbloses Öl.

DC R_f = 0.31 (*n*-Hexan/EtOAc = 2:1).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3390, 2958, 2924, 2871, 2852, 1733, 1603, 1525, 1444, 1369, 1329, 1259, 1156, 1096, 1071, 1029.

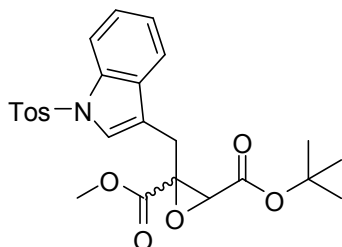
1H -NMR δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1.47 (s, 9H), 3.68 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.86 (s, 1H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 28.0, 34.3, 51.9, 52.7, 62.8, 67.8, 82.0, 164.5, 165.7, 170.4.

MS (EI) m/z 275 ($M+H$)⁺, 257, 243, 225, 193, 162, 141, 125, 97, 85, 71.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{12}H_{19}O_7$ ($M+H$)⁺ 275.1120; gef. 275.1125.

4-*tert*-Butyl-2-methyl-2-({1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1*H*-indol-3-yl}methyl)oxiran-2,3-dicarboxylat (448). (*E*)-Alken **419** (970 mg, 2.0 mmol), *tert*-



Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na_2SO_3 (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 310 mg (32%) **448** als gelben Feststoff.

DC R_f = 0.31 (*n*-Hexan/EtOAc = 2:1).

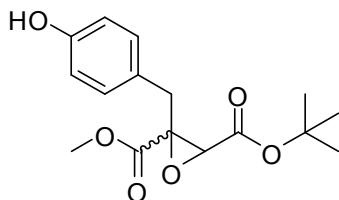
IR ν_{max} (cm^{-1}) 3337, 3132, 3060, 2978, 2950, 2856, 1709, 1581, 1525, 1493, 1460, 1431, 1393, 1368, 1334, 1267, 1194, 1177, 1153, 1079, 745.

1H -NMR δ_H (400 MHz; $DMSO-d_6$) 1.39 (s, 9H), 1.40 (s, 3H), 3.59 – 3.67 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.02 – 4.12 (m, 1H), 7.13 – 7.22 (m, 4H), 7.46 (d, J = 8.06 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 2.15 Hz, 2H), 8.01 (s, 1H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; $DMSO-d_6$) 14.1, 27.7, 35.3, 51.7, 60.3, 66.9, 80.3, 110.0, 112.1, 118.0, 119.3, 120.4, 122.4, 122.7, 127.2, 129.6, 132.4, 135.7, 143.3, 167.8, 169.8.

MS (EI)	m/z 485 (M^+), 472, 447, 432, 402, 371, 328, 315, 287, 260, 242, 228, 214, 200, 182, 154, 130, 120, 91, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{25}H_{27}O_7N_1S_1$ (M^+) ⁺ 485.1508; gef. 485.1511.

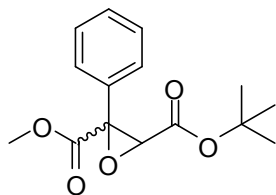
4-*tert*-Butyl-2-methyl-2-(4-hydroxybenzyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat (449). (*E*)-Alken **418**



(1168 mg, 4.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 1.5 ml, 6.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 2.93 ml, 4.4 mmol), Na_2SO_3 (756 mg, 6.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 370 mg (30%) **449** als farbloses Öl.

DC	R_f = 0.21 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 2980, 2960, 2934, 2872, 1727, 1468, 1458, 1394, 1369, 1291, 1277, 1259, 1224, 1151, 1131, 1111, 1068.
1H-NMR	δ_H (400 MHz; CD_3OD) 1.42 (s, 9H), 3.51 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.77 (s, 1H), 5.63 (br s, 1H), 6.73 (d, J = 8.60 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 8.33 Hz, 2H).
^{13}C-NMR	δ_C (100 MHz; CD_3OD) 28.2, 40.2, 52.6, 61.5, 65.2, 82.5, 116.5, 123.7, 131.3, 149.6, 166.0, 170.5.
MS (EI)	m/z 308 (M^+), 277, 251, 235, 207, 193, 180, 147, 122, 108, 94, 78, 65, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{16}H_{20}O_6$ (M^+) ⁺ , 308.1260; gef. 308.1269.

4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-phenyloxiran-2,3-dicarboxylat (450). (*E*)-Alken **408** (524 mg, 2.0



mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na_2SO_3 (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 362 mg (65%) **450** als farbloses Öl.

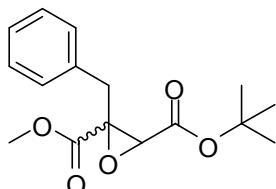
DC	R_f = 0.21 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 6:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3065, 3033, 3002, 2980, 2956, 2935, 2875, 1742, 1498, 1478, 1453, 1437, 1394, 1369, 1312, 1283, 1259, 1222, 1204, 1154, 1097, 697.
1H-NMR	δ_H (400 MHz; $DMSO-d_6$) 1.43 (s, 9H), 3.74 (s, 3H), 3.95 (s, 1H), 7.35 – 7.39 (m, 2H), 7.43 – 7.45 (m, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.5, 52.6, 59.4, 63.5, 82.8, 126.0, 128.9, 129.6, 132.7, 164.8, 165.9.

MS (EI) m/z 279 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 258, 244, 222, 205, 177, 163, 146, 135, 129, 121, 105, 89, 77, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 279.1232; gef. 279.1227.

4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-benzyloxiran-2,3-dicarboxylat (451). (*E*)-Alken **409** (552 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na_2SO_3 (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 7:1). Man erhält 363 mg (62%) **451** als farbloses Öl.



DC R_f = 0.24 (*n*-Hexan/EtOAc = 7:1).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3060, 3026, 2978, 2952, 2932, 2873, 1728, 1495, 1478, 1448, 1436, 1393, 1368, 1328, 1269, 1221, 1204, 1153, 1096, 706.

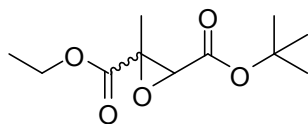
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.38 (s, 9H), 3.31 (s, 2H), 3.40 (s, 1H), 3.74 (s, 1H), 7.38 – 7.44 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.6, 34.4, 52.0, 60.4, 67.7, 80.5, 126.2, 128.7, 129.0, 134.5, 167.2, 169.5.

MS (EI) m/z 293 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 276, 248, 220, 203, 189, 176, 161, 144, 131, 121, 115, 91, 77, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 293.1388; gef. 293.1397.

4-*tert*-Butyl-2-ethyl-2-methyloxiran-2,3-dicarboxylat (452). (*E*)-Alken **404** (428 mg, 2.0 mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na_2SO_3 (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 10:1). Man erhält 253 mg (55%) **452** als farbloses Öl.



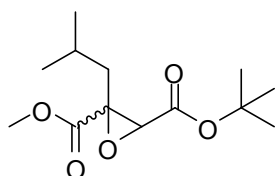
DC R_f = 0.17 (*n*-Hexan/EtOAc = 10:1).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 2982, 2937, 2909, 2875, 1740, 1477, 1459, 1420, 1394, 1370, 1327, 1276, 1260, 1219, 1153, 1089, 1023.

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.29 (t, J = 7.12 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.61 (s, 3H), 3.34 (s, 1H), 4.21 (q, J = 7.12 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 12.7, 14.0, 27.6, 56.5, 57.8, 60.4, 82.8, 165.2, 167.3.
MS (EI)	m/z 231 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 219, 203, 189, 175, 155, 143, 131, 115, 83, 75, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ 231.1232; gef. 231.1229.

4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-isobutyloxiran-2,3-dicarboxylat (453). (*E*)-Alken **406** (484 mg, 2.0



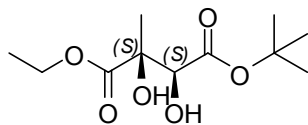
mmol), *tert*-Butylhydroperoxid (4.0 M, 0.75 ml, 3.0 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M, 1.47 ml, 2.2 mmol), Na_2SO_3 (378 mg, 3.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 335 mg (65%) **453** als farbloses Öl.

DC	R_f = 0.26 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 10:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 2980, 2959, 2936, 2873, 1738, 1457, 1437, 1393, 1369, 1329, 1313, 1271, 1259, 1223, 1152, 1095.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.91 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.58 Hz, 3H), 1.49 (s, 9H), 1.56 – 1.60(m, 1H), 1.89 – 1.96 (m, 1H), 2.05 – 2.10 (m, 1H), 3.56 (s, 1H), 3.76 (s, 3H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.6, 22.9, 25.7, 28.0, 34.6, 52.8, 56.9, 61.0, 83.2, 165.4, 169.4.
MS (EI)	m/z 258 (M^+) ⁺ , 241, 225, 187, 169, 155, 129, 111, 85, 71, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (M^+) ⁺ 258.1467; gef. 258.1462.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der (S,S)-Diole (454 - 457)

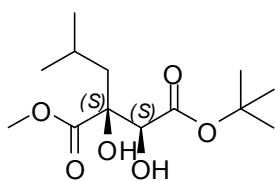
Zu einer Suspension von AD-mix- β (1.4 g/mmol) in *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 10 ml) gibt man über einen Zeitraum von 10 min in zwei Portionen Methansulfonamid (95 mg, 1.0 mmol) zu und rührt für weitere 5 min bei Raumtemperatur. Danach erfolgt die Zugabe eines Alkens (1.0 mmol) über eine Spritzenpumpe (0.1 ml/h). Die Reaktionslösung wird nach erfolgter Zugabe bei Raumtemperatur für 16 h kräftig gerührt (es bildet sich eine hochviskose Suspension). Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) gibt man der Reaktionslösung zuerst Na_2SO_3 (385 mg) gefolgt von Ethylacetat (20 ml) zu und rührt für weitere 15 min. Schließlich trennt man die Phasen wonach die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat (12 ml) extrahiert wird. Nacheinander wäscht man die organische Phase mit jeweils 12 ml 0.5 M HCl und 2 M KOH, trocknet über MgSO_4 und filtriert über eine kurze Celite-Säule (Celite⁵⁰⁰). Die Säule wird mit Ethylacetat (10 ml) nachgespült und die flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt über eine Kieselgelsäule (Kieselgel; *n*-Hexan/Ethylacetat).

(S,S)-4-tert-Butyl-1-ethyl-2,3-dihydroxy-2-methyl-succinat (454). Alken **404** (1712 mg, 8.0 mmol), AD-mix- β (11.2 g, 1.4 g/mmol), Methansulfonamid (760 mg, 8.0 mmol), *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 80 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1825 mg (92%) **454** als farbloses Öl.



DC	$R_f = 0.21$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +29.0$ ($c = 0.5$, MeOH).
Enant.überschuss	$ee = 99\%$ ($ee = 85\%$ für 458).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3498, 2981, 2939, 2910, 2877, 1734, 1597, 1458, 1395, 1370, 1284, 1251, 1160, 1119, 1078, 1020, 845.
$^1\text{H-NMR}$	δ_H (400 MHz; CDCl_3) 1.29 (t, $J = 7.12$ Hz, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.50 (s, 9H), 3.10 (br s, 1H), 3.37 (br s, 1H), 4.19 (s, 1H), 4.25 (q, $J = 7.16$ Hz, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_C (100 MHz; CDCl_3) 14.0, 22.0, 28.0, 62.3, 75.0, 76.8, 83.6, 170.4, 174.4.
MS (EI)	m/z 249 ($\text{M}+\text{H}^+$), 233, 221, 193, 159, 147, 119, 99, 81, 69.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 249.1338; gef. 249.1331.
HPLC-ESI-MS	m/z 249 ($\text{M}+\text{H}^+$), 266 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$), 271 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 287 ($\text{M}+\text{K}^+$).

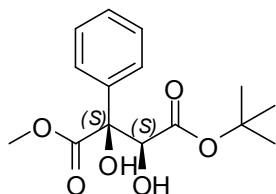
(S,S)-4-tert-Butyl-1-ethyl-2,3-dihydroxy-2-isobutyl-succinat (455). Alken **406** (1936 mg, 8.0 mmol), AD-mix- β (11.2 g, 1.4 g/mmol), Methansulfonamid (760 mg, 8.0 mmol), *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 80 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1744 mg (79%) **455** als weißen Feststoff (Nadeln).



DC	$R_f = 0.33$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +11.7$ ($c = 0.54$, MeOH).
Enant.überschuss	$ee = 90\%$ ($ee = 53\%$ für 459).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3507, 2977, 2956, 2933, 2872, 1735, 1458, 1441, 1395, 1370, 1285, 1257, 1234, 1159, 1094, 842.
$^1\text{H-NMR}$	δ_H (400 MHz; CDCl_3) 0.83 (d, $J = 6.58$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.58$ Hz, 3H), 1.51 (s, 9H), 1.61 – 1.69 (m, 1H), 1.70 – 1.89 (m, 2H), 3.30 (br s, 1H), 3.46 (br s, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.11 (s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_C (100 MHz; CDCl_3) 23.3, 24.2, 24.3, 28.1, 42.8, 52.9, 75.6, 80.2, 83.6, 170.5, 174.8.

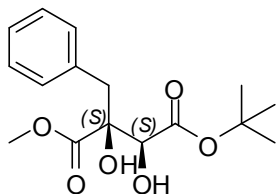
MS (EI)	m/z 277 (M+H) ⁺ , 259, 221, 201, 175, 161, 115, 85.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₃ H ₂₅ O ₆ (M+H) ⁺ 277.1651; gef. 277.1649.
HPLC-ESI-MS	m/z 277 (M+H) ⁺ , 294 (M+NH ₄) ⁺ , 299 (M+Na) ⁺ , 315 (M+K) ⁺ .

(S,S)-4-tert-Butyl-1-ethyl-2,3-dihydroxy-2-phenyl-succinat (456). Alken **408** (2096 mg, 8.0 mmol), AD-mix-β (11.2 g, 1.4 g/mmol), Methansulfonamid (760 mg, 8.0 mmol), *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 80 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1965 mg (83%) **456** als weißen Feststoff (Nadeln).



DC	R_f = 0.24 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20}$ = +42.7 (c = 0.52, MeOH).
Enant.überschuss	ee = 99% (ee = 90% für 460).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3494, 3062, 3027, 3004, 2979, 2956, 2930, 2874, 2852, 1732, 1495, 1450, 1437, 1395, 1369, 1287, 1254, 1159, 1129, 1103, 1074, 734, 698.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 1.07 (s, 9H), 3.85 (s, 3H), 4.02 (br s, 1H), 4.80 (br s, 1H), 4.96 (s, 1H), 7.31 – 7.39 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; CDCl ₃) 27.4, 53.8, 75.4, 82.8, 83.8, 126.3, 127.9, 128.0, 137.3, 169.7, 173.3.
MS (EI)	m/z 296 (M) ⁺ , 240, 221, 195, 181, 165, 146, 135, 105, 77, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₅ H ₂₀ O ₆ (M) ⁺ 296.1259; gef. 296.1249.
HPLC-ESI-MS	m/z 297 (M+H) ⁺ , 314 (M+NH ₄) ⁺ , 319 (M+Na) ⁺ , 335 (M+K) ⁺ .

(S,S)-4-tert-Butyl-1-ethyl-2,3-dihydroxy-2-benzyl-succinat (457). Alken **409** (2210 mg, 8.0 mmol), AD-mix-β (11.2 g, 1.4 g/mmol), Methansulfonamid (760 mg, 8.0 mmol), *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 80 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1786 mg (72%) **457** als weißen Feststoff.



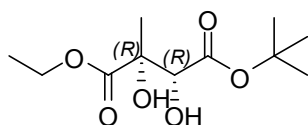
DC	R_f = 0.28 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20}$ = +4.2 (c = 0.53, MeOH).
Enant.überschuss	ee = 80% (ee = 60% für 461).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3503, 3458, 3086, 3064, 3032, 3005, 2977, 2954, 2933, 2852, 1735, 1495, 1455, 1446, 1394, 1370, 1289, 1256, 1225, 1209, 1160, 1110, 1077, 1045, 842, 700.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 1.15 (br s, 1H), 1.55 (s, 9H), 3.12 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.22 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.43 (br s, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.29 (s, 1H), 7.18 – 7.28 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 28.1, 41.1, 52.9, 74.8, 80.7, 83.9, 127.1, 128.2, 130.1, 135.3, 170.4, 173.3.
MS (EI)	m/z 311 (M+H) ⁺ , 293, 255, 235, 191, 159, 131, 91, 76.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₂₃ O ₆ (M+H) ⁺ 311.1494; gef. 311.1495.
HPLC-ESI-MS	m/z 311 (M+H) ⁺ , 328 (M+NH ₄) ⁺ , 333 (M+Na) ⁺ , 349 (M+K) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der (*R,R*)-Diole (458 - 461)

Zu einer Suspension von AD-mix- α (1.6 g/mmol) in *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 15 ml) gibt man über einen Zeitraum von 10 min in zwei Portionen Methansulfonamid (124 mg, 1.3 mmol) zu und rührt für weiter 5 min bei Raumtemperatur. Danach erfolgt die Zugabe eines Alkens (1.0 mmol) über eine Spritzenpumpe (0.1 ml/h). Die Reaktionslösung wird nach erfolgter Zugabe bei Raumtemperatur für 20 h kräftig gerührt (es bildet sich eine hochviskose Suspension). Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) gibt man der Reaktionslösung zuerst Na₂SO₃ (440 mg) gefolgt von Ethylacetat (30 ml) zu und rührt für weiter 15 min. Schließlich trennt man die Phasen wonach die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat (12 ml) extrahiert wird. Nacheinander wäscht man die organische Phase mit jeweils 15 ml 0.5 M HCl und 2 M KOH, trocknet über MgSO₄ und filtriert über eine kurze Celite-Säule (Celite⁵⁰⁰). Die Säule wird mit Ethylacetat (15 ml) nachgespült und die flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt über eine Kieselgelsäule (Kieselgel; *n*-Hexan/Ethylacetat).

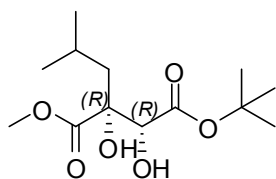
(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-1-ethyl-2,3-dihydroxy-2-methyl-succinat (458). Alken **404** (1712 mg, 8.0 mmol), AD-mix- α (12.8 g, 1.6 g/mmol), Methansulfonamid (992 mg, 8.0 mmol), *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 120 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1567 mg (79%) **458** als farbloses Öl.



DC	R_f = 0.24 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -27.8 (c = 0.52, MeOH).
Enant.überschuss	ee = 85% (ee = 99% für 454).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3498, 2981, 2939, 2910, 2877, 1733, 1477, 1458, 1395, 1370, 1285, 1250, 1160, 1119, 1078, 1020, 845.

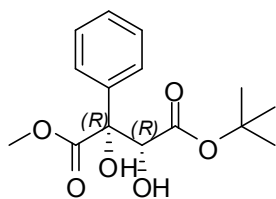
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 1.30 (t, J = 7.52 Hz, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.51 (s, 9H), 3.00 (br s, 1H), 3.33 (br s, 1H), 4.20 (s, 1H), 4.27 (q, J = 7.12 Hz, 2H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 14.1, 22.1, 28.1, 62.4, 75.1, 76.8, 83.7, 170.4, 174.4.
MS (EI)	m/z 249 (M+H) ⁺ , 233, 221, 192, 147, 117, 90, 76, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₁ H ₂₁ O ₆ (M+H) ⁺ 249.1338; gef. 249.1331.
HPLC-ESI-MS	m/z 249 (M+H) ⁺ , 266 (M+NH ₄) ⁺ , 271 (M+Na) ⁺ , 287 (M+K) ⁺ .

(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2,3-dihydroxy-2-isobutyl-succinat (459). Alken **406** (1936 mg, 8.0 mmol), AD-mix- α (12.8 g, 1.6 g/mmol), Methansulfonamid (992 mg, 8.0 mmol), *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 120 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1435 mg (65%) **459** als weißen Feststoff (Nadeln).



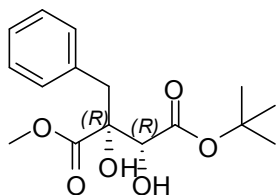
DC	R_f = 0.38 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -10.3 (c = 0.53, MeOH).
Enant.überschuss	ee = 53% (ee = 90% für 455).
IR	ν_{max} (cm ⁻¹) 3509, 2977, 2957, 2934, 2871, 1736, 1458, 1441, 1395, 1370, 1257, 1234, 1159, 1039, 842.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 0.82 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 0.94 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.24 (br s, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.62 – 1.69 (m, 1H), 1.76 – 1.89 (m, 2H), 3.33 (br s, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.11 (s, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 23.3, 24.2, 24.3, 28.1, 42.8, 52.9, 75.6, 80.2, 83.6, 170.5, 174.8.
MS (EI)	m/z 277 (M+H) ⁺ , 259, 235, 221, 201, 175, 157, 115, 85.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₃ H ₂₅ O ₆ (M+H) ⁺ 277.1651; gef. 277.1651.
HPLC-ESI-MS	m/z 277 (M+H) ⁺ , 294 (M+NH ₄) ⁺ , 299 (M+Na) ⁺ , 315 (M+K) ⁺ .

(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2,3-dihydroxy-2-phenyl-succinat (460). Alken **408** (2096 mg, 8.0 mmol), AD-mix- α (12.8 g, 1.6 g/mmol), Methansulfonamid (992 mg, 8.0 mmol), *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 120 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1515 mg (64%) **460** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.21$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -40.6$ ($c = 0.51$, MeOH).
Enant.überschuss	$ee = 90\%$ ($ee = 99\%$ für 456).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3494, 3091, 3061, 3027, 3002, 2979, 2955, 2928, 2871, 2853, 1733, 1495, 1450, 1437, 1395, 1369, 1288, 1254, 1160, 1130, 1102, 1074, 734, 698.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.07 (s, 9H), 3.82 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 4.03 (br s, 1H), 4.80 (br s, 1H), 7.30 – 7.38 (m, 3H), 7.62 – 7.71 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 27.1, 52.5, 75.9, 80.0, 81.4, 126.2, 127.3, 127.5, 138.5, 169.1, 172.7.
MS (EI)	m/z 296 (M^+), 240, 221, 195, 181, 165, 146, 135, 105, 77, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$ (M^+) ⁺ 296.1259; gef. 296.1260.
HPLC-ESI-MS	m/z 297 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 314 ($\text{M}+\text{NH}_4$) ⁺ , 319 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 335 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

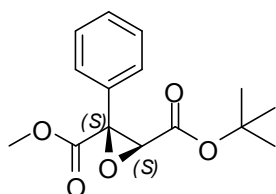
(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2,3-dihydroxy-2-benzyl-succinat (461**).** Alken **409** (2210 mg, 8.0 mmol), AD-mix- α (12.8 g, 1.6 g/mmol), Methansulfonamid (992 mg, 8.0 mmol), *tert*-Butanol/Wasser (1:1, 120 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 1538 mg (62%) **461** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.26$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -4.6$ ($c = 0.52$, MeOH).
Enant.überschuss	$ee = 60\%$ ($ee = 80\%$ für 457).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3506, 3459, 3086, 3066, 3031, 3006, 2977, 2932, 2870, 2856, 1735, 1495, 1455, 1448, 1392, 1371, 1290, 1254, 1225, 1200, 1163, 1110, 1076, 1045, 851, 699.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.28 (br s, 1H), 1.58 (s, 9H), 3.15 (d, $J = 13.70$ Hz, 1H), 3.25 (d, $J = 13.70$ Hz, 1H), 3.47 (br s, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.32 (s, 1H), 7.21 – 7.23 (m, 2H), 7.26 – 7.31 (m, 3H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 28.1, 41.0, 52.8, 74.8, 80.7, 83.9, 127.0, 128.2, 130.1, 135.3, 170.4, 173.2.
MS (EI)	m/z 311 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 293, 255, 235, 191, 159, 131, 103, 91, 76.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ 311.1494; gef. 311.1492.
HPLC-ESI-MS	m/z 311 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 328 ($\text{M}+\text{NH}_4$) ⁺ , 333 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 349 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der (S,S)-; (R,R)-Epoxide (462 - 465)

Zu einer Lösung von 2,3-Diol (1.0 mmol), und *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (1.8 mg, 0.0096 mmol) in DCM (1.2 ml) wird bei Raumtemperatur langsam Trimethylorthoacetat (152 μ l, 1.21 mmol), zugetropft. Folgend wird die Reaktionslösung für 15 min gerührt und danach die flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck entfernt. Teile des entstandenen Methanols werden am Hochvakuum entfernt (ca. 2 min). Das Zwischenprodukt wird in DCM (1.2 ml) aufgenommen und langsam unter Rühren mit Triethylamin (2.8 μ l, 0.02 mmol) versetzt (Puffer). Nach 5 min kühlt man die Reaktionslösung auf 0 °C und gibt über einen Zeitraum von 10 min der Reaktionslösung Acetylbromid (89.5 μ l, 1.21 mmol) zu. Während der Zugabe darf die Temperatur der Reaktionslösung 30 °C nicht überschreiten. Nach 30 – 60 min (DC-Kontrolle, 2:1; *n*-Hexan/Ethylacetat) entfernt man das Lösungsmittel unter reduziertem Druck, nimmt den Rückstand in Methanol (4.0 ml) auf und gibt unter starkem Rühren in zwei Portionen K₂CO₃ (240 mg, 1.74 mmol) zu. Nach 70 min (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung in ges. NH₄Cl-Lösung (8.0 ml) gegossen und danach dreimal mit DCM (6.0 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck am Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über eine Kieselgelsäule (Kieselgel; *n*-Hexan/Ethylacetat oder *n*-Hexan/Diethylether).

(S,S)-4-tert-Butyl-1-methyl-2-phenyloxiran-2,3-dicarboxylat (462). (S,S)-Diol **456** (592

mg, 2.0 mmol), *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (3.6 mg, 0.019 mmol), Trimethylorthoacetat (304 μ l, 2.42 mmol), Acetylbromid (179 μ l, 2.42 mmol), K₂CO₃ (480 mg, 3.48 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 473 mg (85%) **462** als farbloses Öl.

DC $R_f = 0.26$ (*n*-Hexan/EtOAc = 5:1).

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +55.8$ (c = 0.52, MeOH).

Enant.überschuss ee = 99% (ee = 92% für **463**).

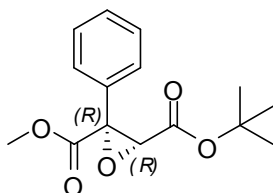
IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3064, 3031, 2979, 2954, 2935, 2875, 1742, 1498, 1479, 1454, 1436, 1311, 1394, 1369, 1312, 1292, 1260, 1223, 1204, 1155, 1097, 697.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.49 (s, 9H), 3.50 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 7.31 – 7.34 (m, 1H), 7.36 – 7.38 (m, 2H), 7.48 – 7.51 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 27.9, 52.7, 60.5, 63.9, 83.4, 126.0, 128.7, 129.3, 133.0, 165.1, 166.3.

MS (EI)	m/z 278 (M^+), 264, 236, 208, 177, 163, 146, 135, 121, 105, 89, 77, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{15}H_{18}O_5$ (M^+) 278.1154; gef. 278.1163.

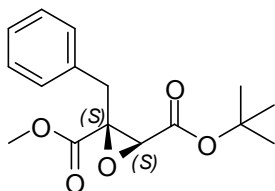
(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-phenyloxiran-2,3-dicarboxylat (463**).** (*R,R*)-Diol **460** (592



mg, 2.0 mmol), *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (3.6 mg, 0.019 mmol), Trimethylorthoacetat (304 μ l, 2.42 mmol), Acetyl-bromid (179 μ l, 2.42 mmol), K_2CO_3 (480 mg, 3.48 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 356 mg (80%) **463** als farbloses Öl.

DC	R_f = 0.19 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 6:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20}$ = -54.4 (c = 0.5, MeOH).
Enant.überschuss	ee = 92% (ee = 99% für 462).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3065, 3033, 3002, 2980, 2956, 2935, 2875, 1742, 1498, 1478, 1453, 1437, 1394, 1369, 1312, 1283, 1259, 1222, 1204, 1154, 1097, 697.
1H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.43 (s, 9H), 3.74 (s, 3H), 3.95 (s, 1H), 7.35 – 7.39 (m, 2H), 7.43 – 7.45 (m, 3H).
^{13}C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 27.5, 52.6, 59.4, 63.5, 82.8, 126.0, 128.9, 129.6, 132.7, 164.8, 165.9.
MS (EI)	m/z 279 ($M+H^+$), 258, 244, 222, 205, 177, 163, 146, 135, 129, 121, 105, 89, 77, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{15}H_{19}O_5$ ($M+H^+$) 279.1232; gef. 279.1227.

(*S,S*)-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-benzyloxiran-2,3-dicarboxylat (464**).** (*S,S*)-Diol **457** (622

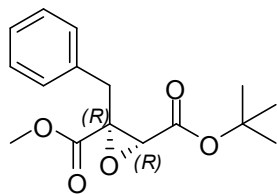


mg, 2.0 mmol), *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (3.6 mg, 0.019 mmol), Trimethylorthoacetat (304 μ l, 2.42 mmol), Acetyl-bromid (179 μ l, 2.42 mmol), K_2CO_3 (480 mg, 3.48 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 452 mg (77%) **464** als farbloses Öl.

DC	R_f = 0.32 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20}$ = +20.1 (c = 0.51, MeOH).
Enant.überschuss	ee = 99% (ee = 70% für 465).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3060, 3026, 2978, 2952, 2932, 2873, 1728, 1495, 1478, 1448, 1436, 1393, 1368, 1328, 1269, 1221, 1204, 1153, 1096, 706.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.38 (s, 9H), 3.31 (s, 2H), 3.40 (s, 1H), 3.74 (s, 1H), 7.38 – 7.44 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 27.6, 34.4, 52.0, 60.4, 67.7, 80.5, 126.2, 128.7, 129.0, 134.5, 167.2, 169.5.
MS (EI)	m/z 293 (M+H) ⁺ , 276, 248, 220, 203, 189, 176, 161, 144, 131, 121, 115, 91, 77, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₂₁ O ₅ (M+H) ⁺ 293.1388; gef. 293.1397.

(*R,R*)-4-tert-Butyl-1-methyl-2-benzyloxiran-2,3-dicarboxylat (465). (*R,R*)-Diol **461** (622



mg, 2.0 mmol), *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (3.6 mg, 0.019 mmol), Trimethylorthoacetat (304 μ l, 2.42 mmol), Acetyl-bromid (179 μ l, 2.42 mmol), K₂CO₃ (480 mg, 3.48 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 410 mg (70%) **465** als farbloses Öl.

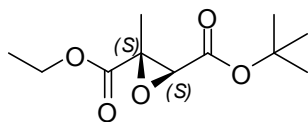
DC	R_f = 0.17 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 6:1).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -18.5 (c = 0.53, MeOH).
Enant.überschuss	ee = 70% (ee = 99% für 464).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3060, 3026, 2978, 2952, 2932, 2873, 1728, 1495, 1478, 1448, 1436, 1393, 1368, 1328, 1269, 1221, 1204, 1153, 1096, 706.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 1.38 (s, 9H), 3.31 (s, 2H), 3.40 (s, 1H), 3.74 (s, 1H), 7.39 – 7.44 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 27.6, 34.4, 52.0, 61.8, 68.1, 80.5, 126.2, 128.7, 129.0, 134.5, 167.2, 169.5.
MS (EI)	m/z 293 (M+H) ⁺ , 276, 248, 220, 203, 189, 176, 161, 144, 131, 121, 115, 91, 77, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₂₁ O ₅ (M+H) ⁺ 293.1388; gef. 293.1389.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der (*S,S*)-; (*R,R*)-Epoxide (**466** - **469**)

Zu einer Lösung von 2,3-Diol (1.0 mmol), und *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (3.0 mg, 0.0158 mmol) in DCM (1.25 ml) wird bei Raumtemperatur Trimethylorthoacetat (149 μ l, 1.19 mmol) zugesetzt und für 15 min stehen gelassen. Danach werden die flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck entfernt. Teile des entstandenen Methanols werden am Hochvakuum entfernt (ca. 2 min). Das Zwischenprodukt wird in DCM (1.2 ml)

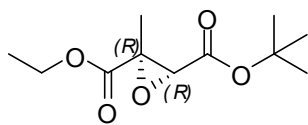
aufgenommen und langsam unter Rühren mit Trimethylsilylchlorid (127 μ l, 1.2 mmol) versetzt. Nach 105 min (DC-Kontrolle, 3:1; *n*-Hexan/Ethylacetat, Acetoxychlorid R_f 0.22 – 0.36) erwärmt man die Reaktionslösung auf 70 °C und rührt unter Rückfluss für 60 min. Danach wartet man bis die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt ist, entfernt die flüchtigen Komponenten unter reduziertem Druck, nimmt das erhaltene Rohprodukt (Acetoxychlorid) in Methanol (4.0 ml) auf und kühlt die Reaktionslösung auf -17 °C. Unter starkem Rühren wird der Reaktionslösung über einen Zeitraum von 10 min in zwei Portionen K_2CO_3 (165 mg, 1.2 mmol) zugesetzt und für weitere 135 min gerührt. Die Reaktionslösung wird in ges. NH_4Cl -Lösung (6.0 ml) gegossen und danach dreimal mit DCM (5.0 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt über eine Kieselgelsäule (Kieselgel; *n*-Hexan/Ethylacetat oder *n*-Hexan/Diethylether).

(S,S)-4-tert-Butyl-2-ethyl-2-methyloxiran-2,3-dicarboxylat (466). (S,S)-Diol **454** (496 mg, 2.0 mmol), *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (6.0 mg, 0.032 mmol), Trimethylorthoacetat (298 μ l, 2.38 mmol), Trimethylsilylchlorid (254 μ l, 2.4 mmol), K_2CO_3 (330 mg, 2.4 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 372 mg (81%) **466** als farbloses Öl.



DC	R_f = 0.23 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20}$ = +43.2 (c = 0.53, MeOH).
Enant.überschuss	ee = 99% (ee = 83% für 467).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 2982, 2937, 2909, 2875, 1740, 1477, 1459, 1420, 1394, 1370, 1327, 1276, 1260, 1219, 1153, 1089, 1023.
1H-NMR	δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1.29 (t, J = 7.12 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.61 (s, 3H), 3.34 (s, 1H), 4.21 (q, J = 7.16 Hz, 2H).
^{13}C-NMR	δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 14.0, 19.1, 27.9, 58.9, 60.5, 61.7, 83.0, 165.3, 167.6.
MS (EI)	m/z 231 ($M+H$) ⁺ , 213, 203, 175, 157, 147, 129, 101, 84, 73, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{11}H_{19}O_5$ ($M+H$) ⁺ 231.1232; gef. 231.1239.

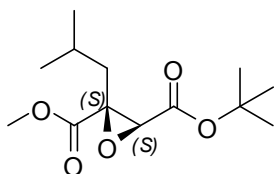
(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-2-ethyl-2-methyloxiran-2,3-dicarboxylat (467). (*R,R*)-Diol **458** (496 mg, 2.0 mmol), *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (6.0 mg, 0.032 mmol), Trimethylorthoacetat (298 μ l, 2.38 mmol), Trimethylsilylchlorid (254 μ l, 2.4 mmol), K_2CO_3 (330 mg, 2.4 mmol). Die



Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 5:1). Man erhält 360 mg (78%) **467** als farbloses Öl.

DC	$R_f = 0.23$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 5:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -42.8$ ($c = 0.52$, MeOH).
Enant.überschuss	$ee = 83\%$ ($ee = 99\%$ für 466).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 2982, 2937, 2909, 2875, 1740, 1477, 1459, 1420, 1394, 1370, 1327, 1276, 1260, 1219, 1153, 1089, 1023.
1H-NMR	δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1.29 (t, $J = 7.12$ Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.61 (s, 3H), 3.34 (s, 1H), 4.21 (q, $J = 7.12$ Hz, 2H).
^{13}C-NMR	δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 12.7, 14.0, 27.6, 56.5, 57.8, 60.4, 82.8, 165.2, 167.3.
MS (EI)	m/z 231 ($M+H$) ⁺ , 219, 203, 189, 175, 155, 143, 131, 115, 83, 75, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{11}H_{19}O_5$ ($M+H$) ⁺ 231.1232; gef. 231.1229.

(*S,S*)-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-isobutyloxiran-2,3-dicarboxylat (468). (*S,S*)-Diol **455** (580 mg, 2.0 mmol), *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (6.0 mg, 0.032 mmol), Trimethylorthoacetat (298 μ l, 2.38 mmol),



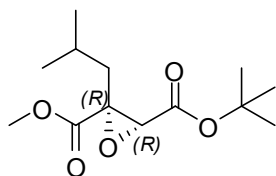
Trimethylsilylchlorid (254 μ l, 2.4 mmol), K_2CO_3 (330 mg, 2.4 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 407 mg (79%) **468** als farbloses Öl.

DC	$R_f = 0.22$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 6:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +39.8$ ($c = 0.53$, MeOH).
Enant.überschuss	$ee = 88\%$ ($ee = 55\%$ für 469).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 2980, 2959, 2936, 2873, 1738, 1457, 1437, 1393, 1369, 1329, 1313, 1271, 1259, 1223, 1152, 1095.
1H-NMR	δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 0.91 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.58$ Hz, 3H), 1.49 (s, 9H), 1.56 – 1.60(m, 1H), 1.89 – 1.96 (m, 1H), 2.05 – 2.10 (m, 1H), 3.56 (s, 1H), 3.76 (s, 3H).
^{13}C-NMR	δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 22.6, 22.9, 25.7, 28.0, 34.6, 52.8, 56.9, 61.0, 83.2, 165.4, 169.4.

MS (EI) m/z 258 (M^+), 241, 225, 187, 169, 155, 129, 111, 85, 71, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{13}H_{22}O_5$ (M^+) 258.1467; gef. 258.1462.

(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-isobutyloxiran-2,3-dicarboxylat (469). (*R,R*)-Diol **459** (580



mg, 2.0 mmol), *p*-Toluolsulfonysäure-monohydrat (6.0 mg, 0.032 mmol), Trimethylorthoacetat (298 μ l, 2.38 mmol), Trimethylsilylchlorid (254 μ l, 2.4 mmol), K_2CO_3 (330 mg, 2.4 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 6:1). Man erhält 325 mg (63%) **469** als farbloses Öl.

DC R_f = 0.20 (*n*-Hexan/EtOAc = 6:1).

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ = -41.1 (c = 0.54, MeOH).

Enant.überschuss ee = 55% (ee = 88% für **468**).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 2980, 2960, 2934, 2872, 1727, 1468, 1458, 1394, 1369, 1291, 1277, 1259, 1224, 1151, 1131, 1111, 1068.

1H -NMR δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 0.94 (d, J = 6.58 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.58 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.75 – 1.80 (m, 2H), 2.01 – 2.06 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.79 (s, 1H).

^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 22.2, 22.5, 22.9, 28.0, 42.0, 52.3, 57.6, 63.3, 83.0, 165.6, 167.8.

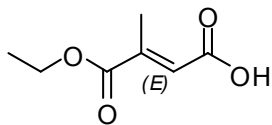
MS (EI) m/z 259 ($M+H^+$), 243, 215, 203, 187, 169, 155, 143, 126, 115, 101, 83, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{13}H_{23}O_5$ ($M+H^+$) 259.1545; gef. 259.1550.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Verseifung (*tert*-Butylester) der Alkene, Diole und Epoxide (**470 – 493**)

Zu einer Lösung von Alken, Diol oder Epoxid (1.0 mmol) in DCM (32.0 mmol, 2.0 ml) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l) zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 5 min gerührt und danach langsam Trifluor-essigsäure (13.0 mmol, 1023 μ l) zugegeben und für weitere 1 – 2 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Diethylether oder *n*-Hexan ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Diethylether (10.0 ml) oder *n*-Hexan (10.0 ml) gewaschen. Das Produkt wird am Hochvakuum für 24 h getrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.

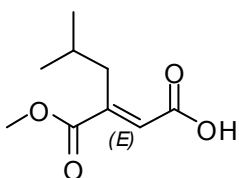
***trans*-[*(E)*]-4-Ethoxy-3-methyl-4-oxo-2-butendsäure (470).** Alken **404** (428 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (10.0 ml). Man erhält 310 mg (98%) **470** als farbloses Wachs.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.23 (t, J = 7.05 Hz, 3H), 2.13 (d, J = 1.61 Hz, 3H), 4.17 (q, J = 7.12 Hz, 2H), 6.55 (s, 1H, *trans*).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 13.9, 14.8, 61.3, 127.7, 141.8, 164.5, 166.4.

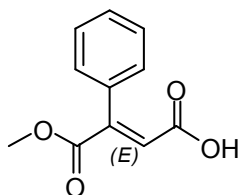
***trans*-[*(E)*]-2-Isobutyl-butendisäure-1-methylester (471).** Alken **406** (484 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (8.0 ml). Man erhält 354 mg (95%) **471** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.83 (d, J = 6.72 Hz, 6H), 1.68 – 1.78 (m, 1H), 2.58 (d, J = 7.25 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 6.58 (s, 1H, *trans*).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 22.3, 28.2, 35.4, 52.7, 129.0, 144.4, 164.6, 167.3.

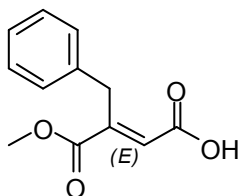
***trans*-[*(E)*]-2-Phenyl-butendisäure-1-methylester (472).** Alken **408** (524 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (10.0 ml). Man erhält 410 mg (99%) **472** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.71 (s, 3H), 6.88 (s, 1H, *trans*), 7.18 – 7.21 (m, 2H), 7.36 – 7.38 (m, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 53.0, 126.9, 128.5, 129.0, 129.4, 134.3, 141.0, 164.0, 169.9.

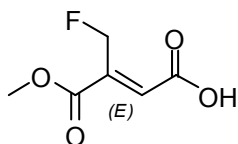
***trans*-[*(E)*]-2-Benzyl-butendisäure-1-methylester (473).** Alken **409** (552 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (10.0 ml). Man erhält 436 mg (99%) **473** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.66 (s, 3H), 4.03 (s, 2H), 6.71 (s, 1H, *trans*), 7.16 – 7.20 (m, 3H), 7.25 – 7.29 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 32.3, 52.5, 125.2, 126.3, 128.4, 130.2, 137.9, 147.7, 166.4, 169.6.

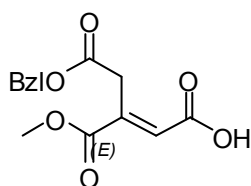
***trans*-[(*E*)]-2-(Fluor-methyl)-butendisäure-1-methylester (474).** Alken **412** (436 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (12.0 ml). Man erhält 298 mg (92%) **474** als gelblichen Feststoff.



¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.72 (s, 3H), 5.07 (d, J = 1.48 Hz, 1H), 5.19 (d, J = 1.48 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 3.16, 1.54 Hz, 1H, *trans*).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 52.3, 81.7, 82.3, 127.8, 127.9, 147.9, 148.3, 158.2, 158.3, 169.9, 170.0.

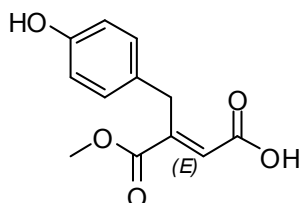
***trans*-[(*E*)]-3-Benzyl-2-methyl-propen-1,2,3-tricarboxylat (475).** Alken **413** (668 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (10.0 ml). Man erhält 490 mg (88%) **475** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; CDCl₃) 3.74 (s, 3H), 3.97 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.95 (s, 1H, *trans*), 7.28 – 7.37 (m, 5H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; CDCl₃) 34.3, 52.7, 66.6, 125.8, 128.4, 128.5, 128.6, 136.1, 140.8, 166.6, 168.9, 167.0.

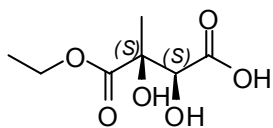
***trans*-[(*E*)]-1-Methyl-2-(4-hydroxybenzyl)-butendisäure (476).** Alken **418** (584 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (10.0 ml). Man erhält 434 mg (92%) **476** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.64 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 6.28 (s, 1H, *trans*), 6.64 (d, J = 8.60 Hz, 2H), 6.76 (d, J = 8.60 Hz, 2H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 36.3, 51.8, 115.4, 128.0, 129.4, 130.1, 132.1, 147.6, 155.8, 166.6, 169.4.

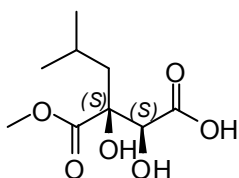
(S,S)-1-Ethyl-2,3-dihydroxy-2-methyl-succinat (477). (S,S)-Diol **454** (496 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (8.0 ml). Man erhält 345 mg (90%) **477** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.28 (t, $J = 7.12$ Hz, 3H), 1.48 (s, 3H), 3.18 (br s, 1H), 3.38 (br s, 1H), 4.19 (s, 1H), 4.27 (q, $J = 7.16$ Hz, 2H), 9.70 (br s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 14.1, 22.1, 62.3, 75.1, 76.8, 170.4, 174.4.

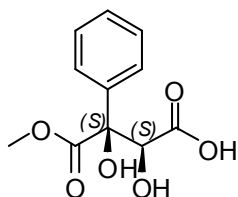
(S,S)-1-Methyl-2,3-dihydroxy-2-isobutyl-succinat (478). (S,S)-Diol **455** (552 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (10.0 ml). Man erhält 413 mg (94%) **478** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.83 (d, $J = 6.58$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.58$ Hz, 3H), 1.62 – 1.70 (m, 1H), 1.76 – 1.89 (m, 2H), 3.31 (br s, 1H), 3.46 (br s, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.11 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 23.3, 24.2, 24.3, 42.8, 53.0, 75.7, 80.1, 170.5, 174.8.

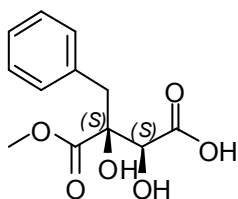
(S,S)-1-Methyl-2,3-dihydroxy-2-phenyl-succinat (479). (S,S)-Diol **456** (592 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (12.0 ml). Man erhält 470 mg (98%) **479** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 3.85 (s, 3H), 4.03 (br s, 1H), 4.80 (br s, 1H), 4.96 (s, 1H), 7.30 – 7.39 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 54.1, 75.7, 83.1, 126.6, 128.2, 128.3, 137.6, 170.0, 173.6.

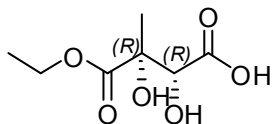
(S,S)-1-Methyl-2,3-dihydroxy-2-benzyl-succinat (480). (S,S)-Diol **457** (620 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (8.0 ml). Man erhält 503 mg (99%) **480** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.15 (br s, 1H), 3.10 – 3.43 (m, 2H), 3.43 (br s, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.29 (s, 1H), 7.18 – 7.26 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 41.4, 53.2, 75.1, 81.1, 127.4, 128.5, 130.4, 135.6, 170.7, 173.6.

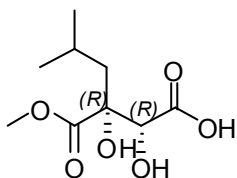
(R,R)-1-Ethyl-2,3-dihydroxy-2-methyl-succinat (481). (R,R)-Diol **458** (496 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (8.0 ml). Man erhält 350 mg (91%) **481** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.30 (t, $J = 7.52$ Hz, 3H), 1.49 (s, 3H), 3.13 (br s, 1H), 3.29 (br s, 1H), 4.20 (s, 1H), 4.28 (q, $J = 7.12$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 14.4, 22.4, 62.7, 75.4, 77.1, 170.8, 174.8.

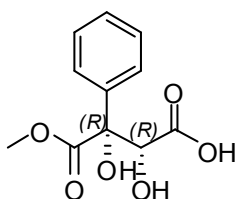
(R,R)-1-Methyl-2,3-dihydroxy-2-isobutyl-succinat (482). (R,R)-Diol **459** (552 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (9.0 ml). Man erhält 414 mg (94%) **482** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.83 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.60 – 1.70 (m, 1H), 1.76 – 1.89 (m, 2H), 3.25 (br s, 1H), 3.45 (br s, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.11 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 23.6, 24.5, 24.6, 43.1, 53.2, 76.0, 80.5, 170.8, 175.1.

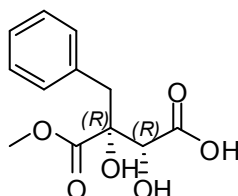
(*R,R*)-1-Methyl-2,3-dihydroxy-2-phenyl-succinat (483). (*R,R*)-Diol **460** (592 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (10.5 ml). Man erhält 436 mg (99%) **483** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.85 (s, 3H), 4.03 (br s, 1H), 4.80 (s, 1H) 4.96 (br s, 1H), 7.30 – 7.38 (m, 3H), 7.62 – 7.70 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 52.8, 76.1, 81.6, 126.4, 127.5, 127.7, 138.7, 169.3, 172.9.

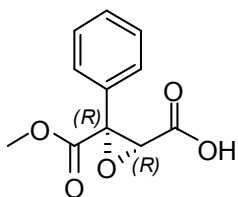
(*R,R*)-1-Methyl-2,3-dihydroxy-2-benzyl-succinat (484). (*R,R*)-Diol **461** (620 mg, 2.0 mmol), Triisopropylsilan (5.0 mmol, 1024 μ l), TFA (26.0 mmol, 2046 μ l), DCM (64.0 mmol, 4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (8.0 ml). Man erhält 498 mg (98%) **484** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.28 (br s, 1H), 3.14 – 3.27 (m, 2H), 3.47 (br s, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.32 (s, 1H), 7.21 – 7.23 (m, 2H), 7.26 – 7.31 (m, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 41.4, 53.2, 75.1, 81.0, 127.4, 128.5, 130.4, 135.6, 170.7, 173.6.

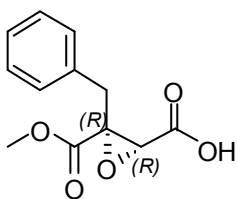
(*R,R*)-1-Methyl-2-phenyloxiran-2,3-dicarboxylat (485). (*R,R*)-Oxiran **462** (278 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l), TFA (13.0 mmol, 1023 μ l), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (5.0 ml). Man erhält 202 mg (91%) **485** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.75 (s, 3H), 3.95 (s, 1H), 7.36 – 7.40 (m, 3H), 7.44 – 7.45 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 52.6, 59.5, 63.5, 126.0, 128.9, 129.6, 138.2, 164.8, 177.5.

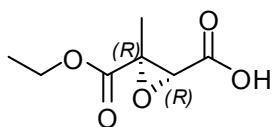
(*R,R*)-1-Methyl-2-benzyloxiran-2,3-dicarboxylat (486). (*R,R*)-Oxiran **465** (292 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l), TFA (13.0 mmol, 1023 μ l), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (6.0 ml). Man erhält 200 mg (85%) **486** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 3.32 (s, 2H), 3.41 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 7.36 – 7.47 (m, 5H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 38.6, 51.6, 61.4, 67.6, 125.8, 128.3, 128.7, 134.0, 169.1, 177.4.

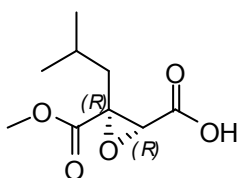
(*R,R*)-1-Ethyl-2-methyloxiran-2,3-dicarboxylat (487). (*R,R*)-Oxiran **467** (230 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l), TFA (13.0 mmol, 1023 μ l), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (7.5 ml). Man erhält 140 mg (81%) **487** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 1.29 (t, $J = 7.12$ Hz, 3H), 1.61 (s, 3H), 4.17 – 4.20 (m, 1H), 4.22 – 4.25 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 13.2, 14.4, 60.7, 60.9, 63.4, 167.7, 178.3.

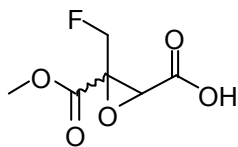
(*R,R*)-1-Methyl-2-isobutyloxiran-2,3-dicarboxylat (488). (*R,R*)-Oxiran **469** (258 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l), TFA (13.0 mmol, 1023 μ l), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (8.0 ml). Man erhält 174 mg (86%) **488** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.94 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.98 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.73 – 1.83 (m, 2H), 2.01 – 2.06 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.79 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.5, 22.8, 23.2, 42.4, 52.7, 57.9, 63.6, 168.1, 178.2.

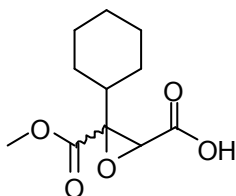
1-Methyl-2-(fluormethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat (489). (*Racemat*)-Oxiran **442** (234 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l), TFA (13.0 mmol, 1023 μ l), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (15.0 ml). Man erhält 142 mg (80%) **489** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 3.61 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.51 – 4.99 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 53.3, 61.4, 61.7, 65.7, 65.8, 80.5, 82.3, 165.7, 165.8, 178.3, 178.4.

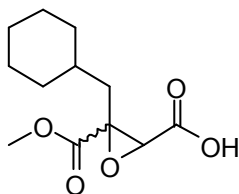
1-Methyl-2-cyclohexyl-oxiran-2,3-dicarboxylat (490). (*Racemat*)-Oxiran **443** (284 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l), TFA (13.0 mmol, 1023 μ l), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (10.0 ml). Man erhält 166 mg (73%) **490** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 1.13 – 1.20 (m, 4H), 1.35 – 1.39 (m, 2H), 1.54 – 1.72 (m, 4H), 2.21 – 2.27 (m, 1H), 3.61 (s, 1H), 3.69 (s, 3H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-d₆) 25.9, 26.6, 28.0, 29.3, 31.0, 42.0, 52.2, 61.0, 66.9, 168.9, 177.9.

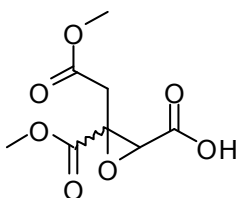
1-Methyl-2-(cyclohexylmethyl)oxiran-2,3-dicarboxylat (491). (*Racemat*)-Oxiran **444** (298 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l), TFA (13.0 mmol, 1023 μ l), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (8.0 ml). Man erhält 213 mg (88%) **491** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 1.15 – 1.26 (m, 4H), 1.52 – 1.77 (m, 6H), 2.19 – 2.28 (m, 3H), 3.65 (s, 1H), 3.69 (s, 3H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-d₆) 25.9, 26.6, 28.0, 31.0, 33.4, 36.2, 52.2, 65.0, 66.9, 168.9, 178.1.

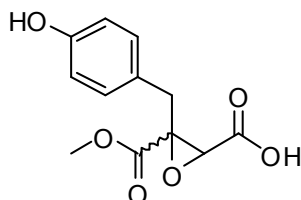
1-Methyl-3,4-anhydro-2-deoxy-3-(methoxycarbonyl)pentarat (492). (*rac*)-Oxiran **447** (274 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l), TFA (13.0 mmol, 1023 μ l), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung *n*-Hexan (15.0 ml). Man erhält 160 mg (74%) **492** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 3.68 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.86 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 34.6, 52.2, 53.0, 63.1, 68.1, 164.8, 166.1, 178.5.

1-Methyl-2-(4-hydroxybenzyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat (493). (*Racemat*)-Oxiran **449** (308 mg, 1.0 mmol), Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μl), TFA (13.0 mmol, 1023 μl), DCM (32.0 mmol, 2.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels Ausfällung Diethylether (12.0 ml). Man erhält 214 mg (85%) **493** als weißen Feststoff.



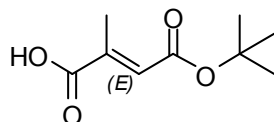
$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; CD_3OD) 3.51 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.77 (s, 1H), 5.63 (br s, 1H), 6.73 (d, $J = 8.60$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.33$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; CD_3OD) 40.6, 53.0, 61.9, 65.6, 116.9, 124.2, 131.8, 155.1, 171.0, 178.1.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Verseifung (Methylester) der Alkene, Diole und Epoxide (494 – 518)

Zu einer Lösung von Alken, Diol oder Epoxid (1.0 mmol) in THF (6.0 ml) wird bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam eine 0.5 M Lithiumhydroxid-Lsg. (2.5 mmol, 5.0 ml) zugetropft und die Lösung für 2 – 4 h gerührt (DC-Kontrolle). Danach wird die Reaktionslösung mit einer 1 M HCl-Lsg. auf pH 2 titriert. Die trübe Lösung wird mit Ethylacetat (30.0 ml) dreimal extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. (30.0 ml) gefolgt von H_2O (30.0 ml) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt wird für weitere 24 h am Hochvakuum getrocknet. Die erhaltenen Produkte wurden ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.

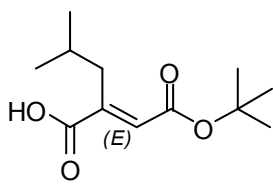
***trans*-[*E*]-2-Methyl-butendisäure-4-*tert*-butylester (494).** Alken **404** (214 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt. Man erhält 143 mg (77%) **494** als weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 1.45 (s, 9H), 2.13 (s, 3H), 6.55 (s, 1H, *trans*).

$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 14.3, 28.1, 81.5, 128.1, 142.2, 164.9, 169.8.

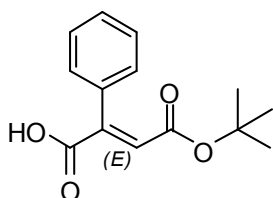
***trans*-[(*E*)]-2-Isobutyl-butendisäure-4-*tert*-butylester (495).** Alken **406** (242 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt. Man erhält 152 mg (67%) **495** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.83 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.71 – 1.78 (m, 1H), 2.59 (d, $J = 7.25$ Hz, 2H), 6.59 (s, 1H, *trans*).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.9, 27.4, 27.7, 41.5, 81.0, 128.5, 144.0, 164.2, 171.3.

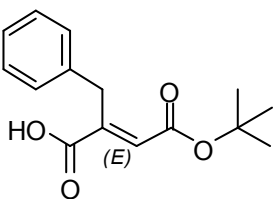
***trans*-[(*E*)]-2-Phenyl-butendisäure-4-*tert*-butylester (496).** Alken **408** (262 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt. Man erhält 176 mg (71%) **496** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.17 (s, 9H), 6.87 (s, 1H, *trans*), 7.18 – 7.21 (m, 3H), 7.35 – 7.39 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.7, 81.8, 128.1, 128.7, 129.3, 129.6, 134.5, 141.3, 164.6, 171.7.

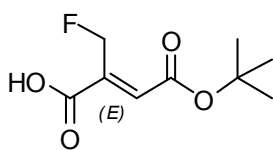
***trans*-[(*E*)]-2-Benzyl-butendisäure-4-*tert*-butylester (497).** Alken **409** (276 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt. Man erhält 207 mg (79%) **497** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.44 (s, 9H), 4.02 (s, 2H), 6.71 (s, 1H, *trans*), 7.16 – 7.18 (m, 3H), 7.25 – 7.28 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 27.6, 36.3, 81.7, 126.3, 128.3, 128.4, 130.9, 137.9, 146.9, 166.4, 170.3.

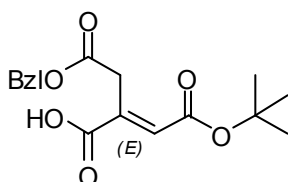
***trans*-[*(E)*]-2-(Fluor-methyl)-butendisäure-4-*tert*-butylester (498).** Alken **412** (218 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt. Man erhält 140 mg (69%) **498** als gelblichen Feststoff.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.42 (s, 9H), 5.07 (d, $J = 1.34$ Hz, 1H), 5.18 (d, $J = 1.34$ Hz, 1H), 6.42 (t, $J = 1.41$ Hz, 1H, *trans*).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 27.5, 75.2, 77.4, 79.7, 135.9, 136.0, 145.8, 146.2, 162.8, 162.9, 165.4, 165.5.

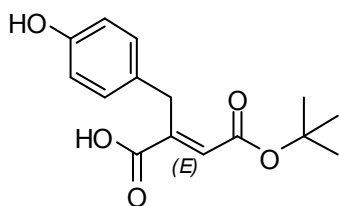
***trans*-[*(E)*]-2-[(Benzyloxy)-2-oxoethyl]-4-*tert*-butoxy-4-oxobutensäure (499).** Alken **415** (334 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt. Man erhält 195 mg (61%) **499** als weißen Feststoff.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.46 (s, 9H), 3.97 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.95 (s, 1H, *trans*), 7.29 – 7.38 (m, 5H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 28.0, 34.4, 66.6, 81.3, 128.4, 128.5, 128.6, 129.3, 136.2, 140.8, 164.9, 168.5, 169.8.

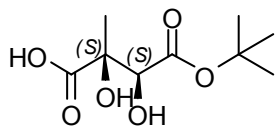
***trans*-[*(E)*]-4-*tert*-Butyl-1-methyl-2-(4-hydroxybenzyl)-butendisäure (500).** Alken **418** (292 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 200 mg (72%) **500** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.45 (s, 9H), 3.89 (s, 2H), 6.28 (s, 1H, *trans*), 6.62 – 6.65 (m, 2H), 6.69 (d, $J = 8.33$ Hz, 2H), 6.78 (br s, 1H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 27.9, 38.4, 80.8, 115.2, 115.3, 129.4, 130.1, 130.9, 132.1, 147.6, 155.8, 166.6, 170.3.

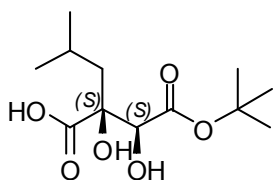
(S,S)-4-tert-Butyl-2,3-dihydroxy-2-methyl-succinat (501). (S,S)-Diol **454** (248 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 165 mg (75%) **501** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.49 (s, 3H), 1.50 (s, 9H), 3.22 (br s, 1H), 3.35 (br s, 1H), 4.19 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 22.3, 28.4, 75.4, 77.1, 83.9, 170.7, 174.7.

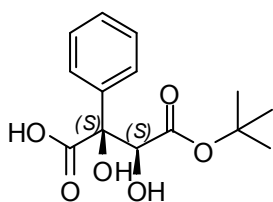
(S,S)-4-tert-Butyl-2,3-dihydroxy-2-isobutyl-succinat (502). (S,S)-Diol **455** (276 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 181 mg (69%) **502** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 0.83 (d, J = 6.58 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 6.58 Hz, 3H), 1.24 (br s, 1H), 1.51 (s, 9H), 1.61 – 1.70 (m, 1H), 1.76 – 1.89 (m, 2H), 3.46 (br s, 1H), 4.11 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 23.6, 24.5, 24.6, 28.4, 43.1, 76.0, 80.5, 84.0, 170.8, 175.1.

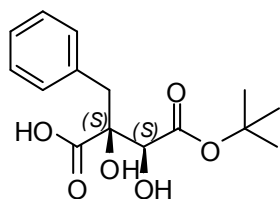
(S,S)-4-tert-Butyl-2,3-dihydroxy-2-phenyl-succinat (503). (S,S)-Diol **456** (296 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 248 mg (88%) **503** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.07 (s, 9H), 4.02 (br s, 1H), 4.80 (br s, 1H), 4.96 (s, 1H), 7.30 – 7.33 (m, 1H), 7.35 – 7.39 (m, 4H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 27.7, 75.7, 84.2, 84.7, 126.6, 128.2, 128.3, 137.6, 171.7, 173.6.

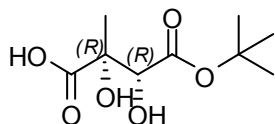
(S,S)-4-tert-Butyl-2,3-dihydroxy-2-benzyl-succinat (504). (S,S)-Diol **457** (310 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 270 mg (91%) **504** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.55 (s, 9H), 3.12 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.22 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.37 (br s, 1H), 3.43 (br s, 1H), 4.29 (s, 1H), 7.18 – 7.20 (m, 2H), 7.22 – 7.24 (m, 2H), 7.25 – 7.28 (m, 1H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 28.5, 41.4, 75.1, 78.4, 84.2, 127.4, 128.5, 130.4, 135.6, 170.7, 176.4.

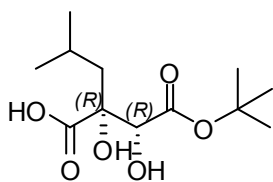
(R,R)-4-tert-Butyl-2,3-dihydroxy-2-methyl-succinat (505). (R,R)-Diol **458** (248 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 163 mg (74%) **505** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.49 (s, 3H), 1.51 (s, 9H), 3.06 (br s, 1H), 3.31 (br s, 1H), 4.20 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 22.1, 28.1, 75.1, 76.1, 83.7, 170.4, 176.6.

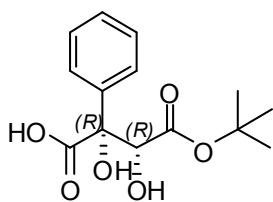
(R,R)-4-tert-Butyl-2,3-dihydroxy-2-isobutyl-succinat (506). (R,R)-Diol **459** (276 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 183 mg (70%) **506** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 0.83 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 0.94 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.50 (s, 9H), 1.60 – 1.70 (m, 1H), 1.76 – 1.89 (m, 2H), 3.31 (br s, 1H), 3.45 (br s, 1H), 4.11 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 23.3, 24.2, 24.3, 28.1, 42.8, 75.6, 76.5, 83.6, 174.8, 176.3.

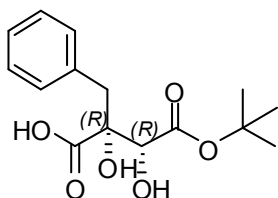
(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-2,3-dihydroxy-2-phenyl-succinat (507). (*R,R*)-Diol **460** (296 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 262 mg (93%) **507** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-*d*₆) 1.07 (s, 9H), 4.03 (br s, 1H), 4.80 (br s, 1H), 4.96 (br s, 1H), 7.27 – 7.39 (m, 3H), 7.62 – 7.71 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-*d*₆) 27.1, 75.9, 80.1, 81.2, 126.2, 127.3, 127.5, 138.5, 172.4, 172.7.

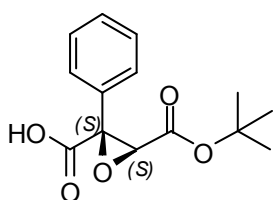
(*R,R*)-4-*tert*-Butyl-2,3-dihydroxy-2-benzyl-succinat (508). (*R,R*)-Diol **461** (310 mg, 1.0 mmol), Lithiumhydroxid (2.5 mmol, 5.0 ml), THF (6.0 ml). Man erhält 272 mg (92%) **508** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.28 (br s, 1H), 1.58 (s, 9H), 3.14 – 3.27 (m, 2H), 3.47 (br s, 1H), 4.32 (s, 1H), 7.21 - 7.29 (m, 5H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 28.5, 41.4, 75.1, 79.0, 84.2, 127.4, 128.5, 130.4, 135.6, 171.1, 176.2.

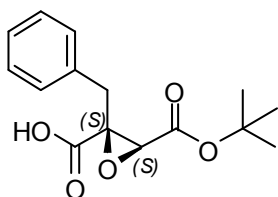
(*S,S*)-4-*tert*-Butyl-2-phenyloxiran-2,3-dicarboxylat (509). (*S,S*)-Epoxid **462** (139 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 95 mg (72%) **509** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.11 (s, 9H), 3.98 (s, 1H), 7.31 – 7.38 (m, 3H), 7.42 – 7.51 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 27.4, 50.8, 56.8, 85.7, 127.5, 128.2, 128.3, 134.3, 171.9, 173.9.

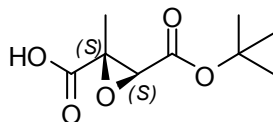
(S,S)-4-tert-Butyl-2-benzyloxiran-2,3-dicarboxylat (510). (S,S)-Epoxid **464** (146 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 96 mg (69%) **510** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1.38 (s, 9H), 3.40 (s, 2H), 4.42 (s, 1H), 7.27 – 7.50 (m, 5H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 27.6, 39.0, 60.4, 67.7, 80.5, 126.2, 128.7, 129.0, 132.9, 172.6, 173.2.

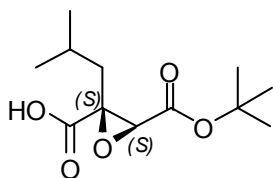
(S,S)-4-tert-Butyl-2-methyloxiran-2,3-dicarboxylat (511). (S,S)-Epoxid **466** (115 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 66 mg (65%) **511** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1.45 (s, 9H), 1.61 (s, 3H), 4.22 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 14.0, 27.9, 60.5, 63.0, 83.0, 173.1, 174.9.

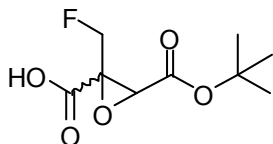
(S,S)-4-tert-Butyl-2-isobutyloxiran-2,3-dicarboxylat (512). (S,S)-Epoxid **468** (129 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 79 mg (64%) **512** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 0.89 (d, J = 6.58 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.58 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.47 – 1.53 (m, 1H), 1.87 – 2.04 (m, 2H), 3.46 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 22.3, 22.6, 22.9, 27.8, 35.3, 50.4, 61.9, 83.0, 172.8, 173.8.

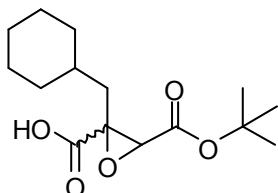
4-tert-Butyl-2-(fluormethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat (513). (Racemat)-Epoxid **442** (117 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 77 mg (70%) **513** als gelblichen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.



¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; CDCl₃) 1.47 (s, 9H), 4.34 (s, 1H), 4.51 – 4.99 (m, 2H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; CDCl₃) 27.8, 64.9, 65.5, 68.0, 68.1, 80.2, 82.0, 83.8, 169.8, 170.0, 173.4, 173.5.

4-tert-Butyl-2-(cyclohexylmethyl)oxiran-2,3-dicarboxylat (514). (*Racemat*)-Epoxid **444**



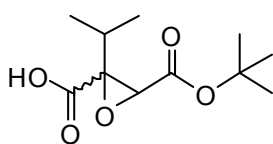
(149 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 106 mg (74%) **514** als weißen Feststoff.

Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-d₆) 1.04 – 1.25 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.63 – 1.79 (m, 6H), 1.93 – 1.99 (m, 1H), 2.20 – 2.25 (m, 2H), 3.64 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO-d₆) 25.7, 26.4, 27.8, 28.6, 33.2, 36.0, 64.8, 66.7, 83.9, 172.6, 173.5.

4-tert-Butyl-2-isopropyl-oxiran-2,3-dicarboxylat (515). (*Racemat*)-Epoxid **445** (128 mg,



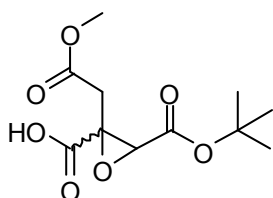
0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml).

Man erhält 152 mg (66%) **515** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-d₆) 0.91 (d, J = 6.85 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.85 Hz, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.92 – 1.99 (m, 1H), 4.07 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO-d₆) 14.1, 14.3, 27.9, 36.3, 64.5, 74.0, 84.1, 173.1, 176.4.

5-tert-Butyl-3,4-anhydro-2-deoxy-3-(methoxycarbonyl)pentarat (516). (*Racemat*)-Epoxid

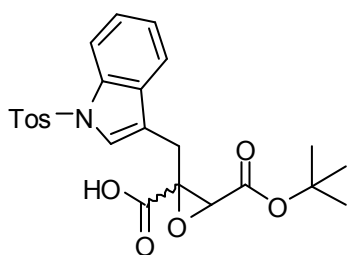


447 (137 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 60 mg (43%) **516** als weißen Feststoff.

Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; CDCl₃) 1.47 (s, 9H), 3.68 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.86 (s, 1H).

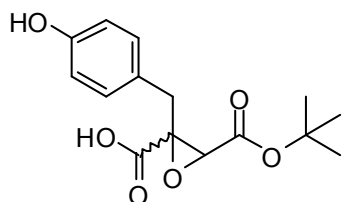
¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; CDCl₃) 28.0, 39.7, 51.9, 62.8, 67.8, 82.0, 165.7, 172.5, 173.4.

4-tert-Butyl-2-({1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-1H-indol-3-yl}methyl)oxiran-2,3-

dicarboxylat (517). (*Racemat*)-Epoxid **448** (243 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 134 mg (54%) **517** als gelblichen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 1.39 (s, 9H), 2.48 (s, 3H), 3.59 – 3.67 (m, 2H), 4.09 – 4.10 (s, 1H), 7.12 – 7.22 (m, 4H), 7.45 (d, J = 8.06 Hz, 2H), 7.68 – 7.80 (m, 2H), 8.04 (s, 1H).

¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.5, 27.7, 35.3, 63.3, 66.9, 80.3, 112.1, 115.9, 118.0, 119.3, 120.4, 125.0, 125.5, 130.5, 131.0, 135.7, 143.4, 174.6, 177.7.

4-tert-Butyl-2-(4-hydroxybenzyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat (518). (*Racemat*)-Epoxid **449**

(154 mg, 0.5 mmol), Lithiumhydroxid (1.25 mmol, 2.5 ml), THF (3.0 ml). Man erhält 102 mg (69%) **518** als weißen Feststoff. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung der nächsten Stufe zugeführt.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; CD₃OD) 1.42 (s, 9H), 3.51 (s, 2H), 3.77 (s, 1H), 5.63 (br s, 1H), 6.73 (d, J = 8.60 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 8.33 Hz, 2H).

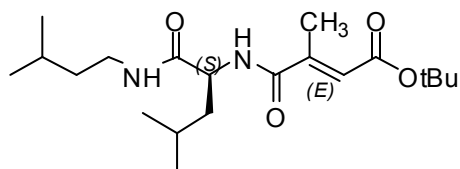
¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; CD₃OD) 28.3, 40.2, 61.5, 68.5, 82.5, 116.5, 123.7, 131.4, 156.0, 170.5, 171.4.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der Tripeptide (528 – 534)

Zu einer Lösung von (*E*)-Alken (1.0 mmol) in DMF (9.3 ml) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Diisopropylethylamin (188 μ l, 1.1 mmol) zugetropft und die Reaktionslösung für 5 min gerührt. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hat tropft man das Dipeptid **321** (240 mg, 1.2 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (5.42 ml) zu und rührt für weitere 5 min. Anschließend wird in zwei Portionen PyBOP (624 mg, 1.2 mmol) zur Reaktionslösung gegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin verdünnt man die Reaktionslösung mit Diethylether (38.5 ml) und rührt für weitere 5 min. Folgend wird die organische Phase dreimal mit ges. NH₄Cl-Lsg. (40.0 ml) gewaschen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird zweimal mit Diethylether (20.0 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel

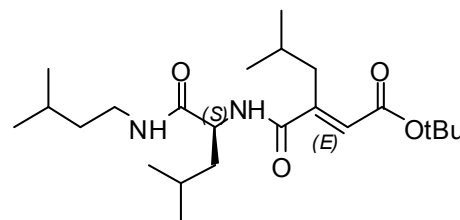
unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat).

Tripeptid (528). Alken **494** (186 mg, 1.0 mmol) in DMF (9.3 ml), Diisopropylethylamin (188 μ l, 1.1 mmol), Dipeptid **321** (240 mg, 1.2 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (5.42 ml), PyBOP (624 mg, 1.2 mmol) Diethylether (38.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 263 mg (68%) **528** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.29$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3295, 3086, 2957, 2932, 2871, 2723, 2617, 2539, 1700, 1623, 1538, 1469, 1437, 1386, 1368, 1279, 1247, 1227, 1161, 1138.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.89 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 0.93 (dd, $J = 6.11$, 3.16 Hz, 6H), 1.37 (q, $J = 7.30$ Hz, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.53 – 1.70 (m, 4H), 2.26 (d, $J = 1.48$ Hz, 3H), 3.17 – 3.28 (m, 2H), 4.43 – 4.48 (m, 1H), 6.09 (br s, 1H), 6.31 (q, $J = 1.43$ Hz, 1H, <i>trans</i>), 6.39 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.2, 22.3, 22.4, 22.8, 24.9, 25.8, 28.1, 37.9, 38.3, 41.4, 52.0, 81.3, 124.3, 146.2, 165.2, 168.4, 171.4.
MS (EI)	m/z 368 (M^+), 353, 312, 295, 283, 254, 227, 199, 182, 169, 138, 113, 86, 71, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 368.2675; gef. 368.2669.
HPLC-ESI-MS	m/z 369 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 386 ($\text{M}+\text{NH}_4$) ⁺ , 391 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 407 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

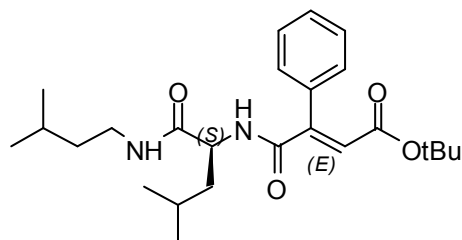
Tripeptid (529). Alken **495** (228 mg, 1.0 mmol) in DMF (9.3 ml), Diisopropylethylamin (188 μ l, 1.1 mmol), Dipeptid **321** (240 mg, 1.2 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (5.42 ml), PyBOP (624 mg, 1.2 mmol) Diethylether (30.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 238 mg (58%) **529** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.47$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3281, 3086, 2957, 2932, 2870, 1718, 1646, 1620, 1552, 1468, 1438, 1386, 1367, 1318, 1278, 1249, 1216, 1170, 1140.

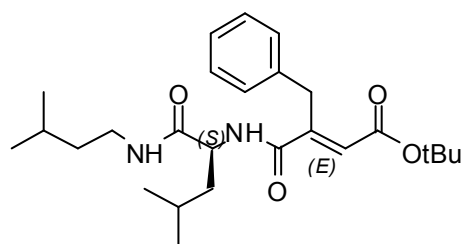
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.86 – 0.89 (m, 12H), 0.92 (d, J = 6.58 Hz, 6H), 1.35 (q, J = 7.30 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.51 – 1.78 (m, 5H), 2.66 – 2.77 (m, 2H), 3.16 – 3.29 (m, 2H), 4.47 – 4.53 (m, 1H), 6.17 (s, 1H, <i>trans</i>), 6.50 – 6.54 (m, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.2, 22.3, 22.4, 22.5, 22.6, 22.8, 24.9, 25.8, 28.1, 28.2, 36.3, 37.9, 38.2, 41.2, 52.0, 81.2, 123.8, 151.1, 165.0, 169.1, 171.5.
MS (EI)	m/z 410 (M^+), 395, 354, 337, 325, 296, 269, 211, 183, 155, 140, 109, 86, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 410.3144; gef. 410.3150.
HPLC-ESI-MS	m/z 411 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 433 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 449 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (530). Alken **496** (248 mg, 1.0 mmol) in DMF (9.3 ml), Diisopropylethylamin (188 μl , 1.1 mmol), Dipeptid **321** (240 mg, 1.2 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (5.42 ml), PyBOP (624 mg, 1.2 mmol) Diethylether (40.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 271 mg (63%) **530** als weißen Feststoff.



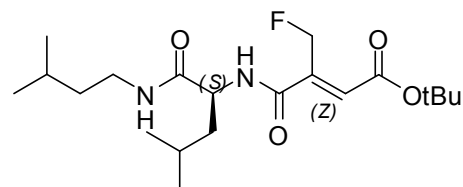
DC	R_f = 0.21 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3271, 3084, 3061, 2956, 2932, 2870, 2180, 1710, 1643, 1620, 1558, 1469, 1444, 1392, 1386, 1367, 1278, 1250, 1161, 698.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.86 (d, J = 6.58 Hz, 6H), 0.88 (d, J = 6.58 Hz, 6H), 1.20 (s, 9H), 1.35 (q, J = 7.25 Hz, 2H), 1.42 – 1.60 (m, 4H), 3.14 – 3.28 (m, 2H), 4.42 – 4.47 (m, 1H), 5.95 (d, J = 8.33 Hz, 1H), 6.21 (br s, 1H), 6.93 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.20 (dd, J = 6.72, 2.96 Hz, 2H), 7.40 – 7.42 (m, 3H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.2, 22.4, 22.5, 22.8, 24.8, 25.8, 27.6, 37.9, 38.2, 40.6, 52.3, 81.5, 125.7, 128.7, 129.0, 129.1, 134.1, 144.2, 164.8, 165.7, 171.0.
MS (EI)	m/z 430 (M^+), 374, 357, 344, 316, 289, 261, 231, 200, 175, 147, 140, 102, 86, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 430.2831; gef. 430.2797.
HPLC-ESI-MS	m/z 431 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 453 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 469 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (531). Alken **497** (262 mg, 1.0 mmol) in DMF (9.3 ml), Diisopropylethylamin (188 μ l, 1.1 mmol), Dipeptid **321** (240 mg, 1.2 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (5.42 ml), PyBOP (624 mg, 1.2 mmol) Diethylether (35.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 311 mg (70%) **531** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.35$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3285, 3086, 3064, 3030, 2957, 2931, 2870, 1716, 1649, 1621, 1553, 1495, 1468, 1454, 1437, 1386, 1367, 1322, 1307, 1246, 1233, 1150, 698.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.75 (t, $J = 6.51$ Hz, 6H), 0.85 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.11 – 1.21 (m, 1H), 1.29 (q, $J = 7.34$ Hz, 2H), 1.34 – 1.38 (m, 1H), 1.44 – 1.59 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 3.08 – 3.20 (m, 2H), 4.19 (s, 2H), 4.31 – 4.37 (m, 1H), 6.11 (br s, 1H), 6.18 (d, $J = 8.19$ Hz, 1H), 6.35 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.15 – 7.27 (m, 5H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 21.8, 22.3, 22.4, 22.9, 24.4, 25.8, 28.1, 33.4, 37.9, 38.2, 40.9, 51.8, 81.6, 124.2, 126.7, 128.2, 128.7, 137.4, 148.7, 165.0, 167.8, 171.2.
MS (EI)	m/z 444 (M^+), 429, 407, 388, 371, 358, 330, 301, 275, 255, 214, 201, 171, 140, 115, 86, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 444.2988; gef. 444.2989.
HPLC-ESI-MS	m/z 445 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 467 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 483 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

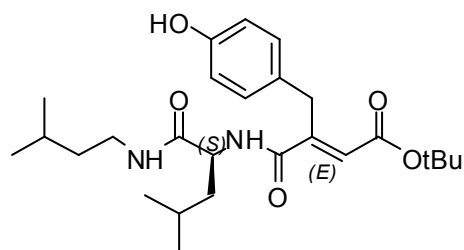
Tripeptid (532). Alken **498** (102 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.65 ml), Diisopropylethylamin (94 μ l, 0.55 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (312 mg, 0.6 mmol) Diethylether (20.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 74 mg (38%) **532** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.19$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3361, 3257, 3048, 2956, 2926, 2871, 2854, 2721, 1709, 1671, 1644, 1549, 1535, 1468, 1456, 1394, 1387, 1368, 1283, 1240, 1226, 1160, 1123, 880, 846.

$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.88 (dd, $J = 9.74, 6.51$ Hz, 6H), 0.92 (dd, $J = 9.74, 6.51$ Hz, 6H), 1.38 – 1.47 (m, 3H), 1.49 (s, 9H), 1.53 – 1.66 (m, 2H), 1.90 – 1.97 (m, 1H), 3.23 – 3.28 (m, 2H), 4.46 – 4.52 (m, 1H), 5.02 – 5.20 (m, 2H), 6.09 (d, $J = 1.61$ Hz, 1H, trans), 6.80 (d, $J = 9.13$ Hz, 1H), 7.17 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 21.3, 22.5, 23.1, 24.9, 25.9, 28.0, 38.1, 38.3, 40.3, 52.4, 81.5, 82.8, 83.2, 121.3, 121.4, 146.5, 146.6, 158.5, 158.6, 164.9, 165.0, 171.2.
MS (EI)	m/z 386 (M^+), 330, 313, 281, 274, 244, 216, 199, 181, 156, 131, 111, 91, 86, 71, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{F}_1\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 386.2580; gef. 386.2574.
HPLC-ESI-MS	m/z 387 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 409 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 425 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

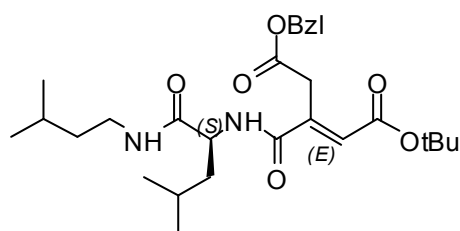
Tripeptid (533). Alken **500** (139 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.65 ml), Diisopropylethylamin (94 μl , 0.55 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (312 mg, 0.6 mmol) Diethylether (25.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 74 mg (32%) **533** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.24$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3293, 3097, 2956, 2926, 2870, 2855, 2720, 1716, 1649, 1624, 1594, 1537, 1514, 1468, 1456, 1386, 1367, 1244, 1232, 1149, 1112, 849.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.69 (d, $J = 6.04$ Hz, 3H), 0.76 (d, $J = 6.31$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.58$ Hz, 6H), 1.23 (q, $J = 6.98$ Hz, 2H), 1.28 – 1.44 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.48 – 1.57 (m, 1H), 2.98 – 3.03 (m, 2H), 3.84 (d, $J = 13.70$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J = 13.57$ Hz, 1H), 4.16 – 4.21 (m, 1H), 6.19 (s, 1H, trans), 6.60 (d, $J = 8.46$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J = 8.46$ Hz, 2H), 7.60 (t, $J = 5.71$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H), 9.14 (s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 21.1, 22.3, 23.0, 24.0, 25.1, 27.8, 31.7, 36.7, 38.0, 40.3, 51.5, 80.7, 114.9, 121.8, 127.8, 129.5, 150.4, 155.8, 165.0, 167.5, 171.4.
MS (EI)	m/z 460 (M^+), 404, 386, 346, 317, 290, 271, 230, 215, 201, 176, 159, 131, 107, 86, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5$ (M^+) ⁺ 460.2937; gef. 460.2939.

HPLC-ESI-MS m/z 461 (M+H)⁺, 483 (M+Na)⁺, 499 (M+K)⁺.

Tripeptid (534). Alken **499** (160 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.65 ml), Diisopropylethylamin (94 μ l, 0.55 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (312 mg, 0.6 mmol) Diethylether (23.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 75 mg (30%) **534** als weißen Feststoff.



DC R_f = 0.28 (*n*-Hexan/EtOAc = 3:1).

IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3297, 3090, 3067, 3035, 2956, 2931, 2870, 2719, 1717, 1651, 1624, 1544, 1499, 1468, 1456, 1437, 1386, 1368, 1324, 1280, 1249, 1214, 1150, 1004, 697.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 0.86 (dd, J = 6.31, 2.82 Hz, 6H), 0.89 (dd, J = 6.31, 2.82 Hz, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.56 – 1.83 (m, 5H), 2.23 – 2.32 (m, 1H), 3.15 – 3.33 (m, 2H), 3.84 (d, J = 17.19 Hz, 1H), 3.96 (d, J = 17.19 Hz, 1H), 4.08 – 4.15 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 6.29 (s, 1H, *trans*), 6.37 (s, 1H), 6.42 (br s, 1H), 7.27 – 7.36 (m, 5H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 21.9, 22.4, 22.5, 22.9, 24.9, 25.9, 28.0, 33.5, 35.0, 38.1, 40.8, 54.3, 66.9, 82.0, 122.7, 128.2, 128.4, 128.5, 143.7, 146.6, 164.3, 164.9, 168.1, 170.5.

MS (EI) m/z 502 (M)⁺, 446, 429, 388, 338, 332, 280, 256, 225, 207, 182, 176, 164, 107, 91, 86, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für C₂₈H₄₂N₂O₆ (M)⁺ 502.3042; gef. 502.3039.

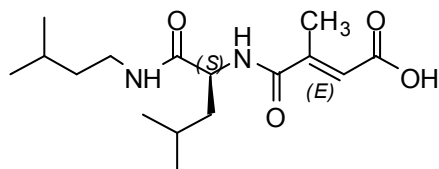
HPLC-ESI-MS m/z 503 (M+H)⁺, 525 (M+Na)⁺, 541 (M+K)⁺.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Entschützung der Tripeptide (535 – 542)

Zu einer Lösung von Tripeptid (1.0 mmol) in DCM (32.0 mmol, 2.0 ml) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Triisopropylsilan (2.5 mmol, 512 μ l) zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 10 min gerührt und danach Trifluoressigsäure (13.0 mmol, 1023 μ l) über eine Spritzenpumpe (1.0 ml/0.5 h) zugegeben und für weitere 2 – 4 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Diethylether oder *n*-Hexan ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Diethylether (10.0 ml) oder *n*-Hexan (10.0 ml) gewaschen. Das Produkt wird zuerst am Hochvakuum für 24 h getrocknet, anschließend in Methanol aufgenommen, mit Wasser ausgefällt und lyophilisiert. Mittels zweimaliger

Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser gefolgt von Methanol/Wasser erhält man einen sauberen weißen Feststoff. Einzelne Tripeptide wurden für die biologische Testierung noch zusätzlich mittels präparativer HPLC (t_R = 10.0 min [15% bis 50% CH₃CN in 30 min]) gereinigt.

Tripeptid (535). Tripeptid **528** (184 mg, 0.5 mmol), Triisopropylsilan (256 μ l, 1.25 mmol), Trifluoressigsäure (512 μ l, 6.5 mmol), DCM (1.05 ml, 16.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 122 mg (78%) **535** als weißen Feststoff.



IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3294, 3085, 2957, 2932, 2871, 2723, 2619, 2538, 1700, 1653, 1623, 1538, 1469, 1437, 1386, 1368, 1279, 1247, 1227, 1161, 1138.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 0.83 (d, J = 7.25 Hz, 6H), 0.86 (d, J = 7.25 Hz, 6H), 1.26 (q, J = 6.98 Hz, 2H), 1.38 – 1.46 (m, 1H), 1.49 – 1.60 (m, 3H), 2.15 (d, J = 1.34 Hz, 3H), 2.99 – 3.11 (m, 2H), 4.25 – 4.30 (m, 1H), 6.26 (d, J = 1.34 Hz, 1H, *trans*), 7.84 (t, J = 5.51 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.06 Hz, 1H), 12.60 (br s, 1H).

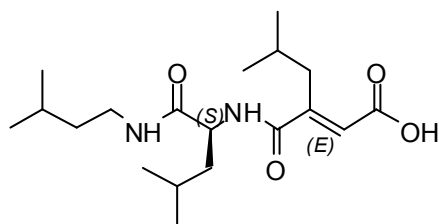
¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-d₆) 19.2, 21.5, 22.3, 22.4, 23.0, 24.4, 25.1, 36.7, 38.0, 40.5, 51.6, 122.1, 147.5, 167.2, 168.0, 171.5.

MS (EI) m/z 312 (M⁺)⁺, 295, 269, 254, 245, 227, 211, 199, 181, 149, 130, 113, 97, 86, 71, 57.

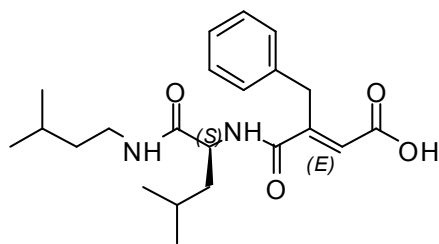
HRMS (EI) m/z ber. für C₁₆H₂₈N₂O₄ (M⁺)⁺ 312.2049; gef. 312.2040.

HPLC-ESI-MS m/z 313 (M+H)⁺, 335 (M+Na)⁺, 351 (M+K)⁺.

Tripeptid (536). Tripeptid **529** (205 mg, 0.5 mmol), Triisopropylsilan (256 μ l, 1.25 mmol), Trifluoressigsäure (512 μ l, 6.5 mmol), DCM (1.05 ml, 16.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 112 mg (63%) **536** als weißen Feststoff.

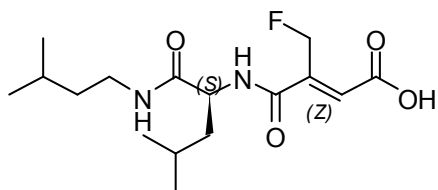


Tripeptid (538). Tripeptid **531** (222 mg, 0.5 mmol), Triisopropylsilan (256 μ l, 1.25 mmol), Trifluoressigsäure (512 μ l, 6.5 mmol), DCM (1.05 ml, 16.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 161 mg (83%) **538** als weißen Feststoff.



IR	ν_{max} (cm ⁻¹) 3288, 3085, 3064, 3030, 2957, 2929, 2870, 2550, 1697, 1652, 1623, 1539, 1495, 1468, 1454, 1436, 1386, 1368, 1304, 1247, 1231, 1187, 698.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.66 (d, J = 6.18 Hz, 3H), 0.75 (d, J = 6.18 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.45 Hz, 6H), 1.22 (q, J = 6.98 Hz, 2H), 1.27 – 1.34 (m, 1H), 1.41 – 1.55 (m, 3H), 2.98 – 3.03 (m, 2H), 4.03 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 4.16 – 4.21 (m, 1H), 4.24 (d, J = 13.97 Hz, 1H), 6.32 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.13 – 7.24 (m, 5H), 7.65 (t, J = 5.64 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 8.33 Hz, 1H), 12.82 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 21.1, 22.4, 23.1, 24.1, 25.1, 32.6, 36.7, 38.1, 40.4, 51.5, 122.3, 126.1, 128.2, 128.5, 137.9, 150.0, 167.1, 167.4, 171.4.
MS (EI)	m/z 388 (M ⁺) ⁺ , 370, 344, 314, 301, 274, 255, 240, 214, 183, 171, 140, 115, 86, 59, 43.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₄ (M ⁺) ⁺ 388.2362; gef. 388.2352.
HPLC-ESI-MS	m/z 389 (M+H) ⁺ , 411 (M+Na) ⁺ , 427 (M+K) ⁺ .

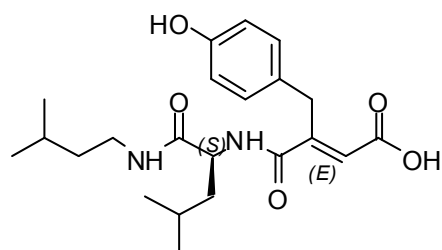
Tripeptid (539). Tripeptid **532** (96 mg, 0.25 mmol), Triisopropylsilan (128 μ l, 0.625 mmol), Trifluoressigsäure (256 μ l, 3.25 mmol), DCM (525 μ l, 8.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 48 mg (58%) **539** als weißen Feststoff.



IR	ν_{max} (cm ⁻¹) 3329, 3257, 3048, 2956, 2926, 2871, 2854, 2719, 1696, 1671, 1644, 1549, 1535, 1468, 1456, 1394, 1387, 1368, 1283, 1240, 1226, 1160, 1123, 1033, 1000, 880, 846.
-----------	--

$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.88 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 0.92 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.38 – 1.47 (m, 3H), 1.53 – 1.63 (m, 2H), 1.90 – 1.97 (m, 1H), 3.23 – 3.28 (m, 2H), 4.46 – 4.51 (m, 1H), 5.02 – 5.16 (m, 2H), 6.08 (d, $J = 1.61$ Hz, 1H, trans), 6.79 (d, $J = 7.39$ Hz, 1H), 7.17 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.0, 22.2, 22.3, 22.5, 23.7, 25.0, 36.9, 37.8, 40.5, 51.1, 74.8, 77.0, 122.1, 122.3, 146.7, 147.0, 156.5, 156.8, 165.2, 165.7, 168.9.
MS (ESI)	m/z 331 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 311, 223, 201, 196, 142.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{F}_1\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ 331.2021; gef. 331.2027.
HPLC-ESI-MS	m/z 331 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 353 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 469 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

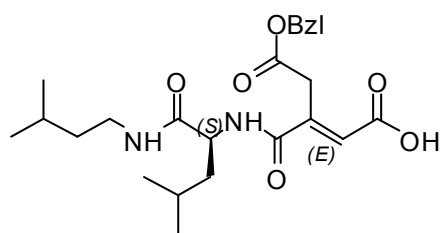
Tripeptid (540). Tripeptid **533** (115 mg, 0.25 mmol), Triisopropylsilan (128 μl , 0.625 mmol),



Trifluoressigsäure (256 μl , 3.25 mmol), DCM (525 μl , 8.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 61 mg (61%) **540** als weißen Feststoff.

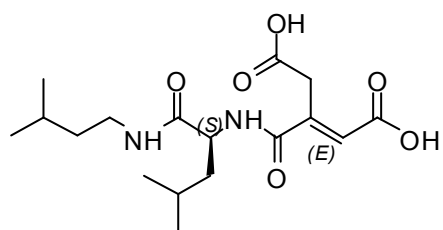
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3291, 3097, 2956, 2926, 2870, 2855, 2719, 1689, 1649, 1624, 1594, 1537, 1514, 1467, 1457, 1388, 1367, 1244, 1232, 1149, 1112, 849, 831, 803.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.68 (d, $J = 5.91$ Hz, 3H), 0.76 (d, $J = 5.91$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.24 (q, $J = 6.98$ Hz, 2H), 1.28 – 1.32 (m, 1H), 1.41 – 1.55 (m, 3H), 2.98 – 3.03 (m, 2H), 3.82 – 3.92 (m, 1H), 4.07 – 4.19 (m, 2H), 6.23 (s, 1H, trans), 6.60 (d, $J = 8.06$ Hz, 2H), 6.95 (dd, $J = 8.33, 2.96$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 7.79$ Hz, 1H), 8.17 (t, $J = 8.87$ Hz, 1H), 9.13 (br s, 1H), 12.75 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 21.1, 22.3, 22.4, 23.0, 24.0, 25.1, 27.8, 36.7, 38.0, 40.4, 51.5, 114.9, 121.8, 127.7, 129.5, 150.4, 155.7, 165.1, 167.5, 171.4.
MS (EI)	m/z 404 (M^+) ⁺ , 386, 317, 201, 176, 159, 149, 131, 111, 97, 84, 66.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ (M^+) ⁺ 404.2311; gef. 404.2315.
HPLC-ESI-MS	m/z 405 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 427 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ .

Tripeptid (541). Tripeptid **534** (125 mg, 0.25 mmol), Triisopropylsilan (128 μ l, 0.625 mmol), Trifluoressigsäure (256 μ l, 3.25 mmol), DCM (525 μ l, 8.0 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 59 mg (54%) **541** als weißen Feststoff.



IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3297, 3090, 3067, 3033, 2956, 2930, 2870, 2720, 1691, 1651, 1624, 1545, 1499, 1468, 1455, 1437, 1386, 1368, 1324, 1282, 1249, 1214, 1150, 697.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 0.88 (d, J = 6.45 Hz, 6H), 0.90 (d, J = 6.45 Hz, 6H), 1.56 – 1.83 (m, 4H), 3.15 – 3.33 (m, 4H), 3.86 (d, J = 17.19 Hz, 1H), 3.96 (d, J = 17.19 Hz, 1H), 4.08 – 4.15 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 6.29 (s, 1H, <i>trans</i>), 6.37 (s, 1H), 6.42 (br s, 1H), 7.30 – 7.36 (m, 5H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 21.9, 22.4, 22.5, 23.0, 24.9, 25.9, 33.5, 35.1, 38.1, 40.8, 54.3, 66.9, 122.7, 128.2, 128.4, 128.5, 143.6, 146.6, 164.2, 164.8, 168.1, 170.5.
MS (ESI)	m/z 447 (M+H) ⁺ , 429, 361, 318, 223, 201, 176, 86.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₂₄ H ₃₅ N ₂ O ₆ (M+H) ⁺ 447.2487; gef. 447.2489.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O ₆ Na ⁺ 469.2298; gef. 469.2301.
HPLC-ESI-MS	m/z 447 (M+H) ⁺ , 469 (M+Na) ⁺ , 483 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (542). Tripeptid **541** (22 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq) in THF (0.3 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.3 ml, 0.15 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 12 mg (68%) **542** als weißen Feststoff.

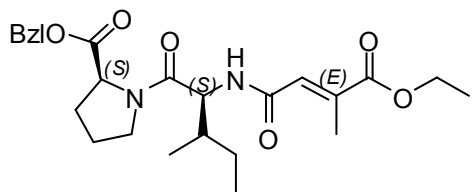


MS (ESI)	m/z 356 (M') ⁺ , 340, 313, 299, 282, 255, 227, 201, 182, 176, 129, 107.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O ₆ (M') ⁺ 356.1947; gef. 356.1954.
HPLC-ESI-MS	m/z 357 (M+H) ⁺ , 379 (M+Na) ⁺ , 395 (M+K) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der Tripeptide (543 – 550)

Zu einer Lösung von (*E*)-Alken (1.0 mmol) in DMF (3.4 ml) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Diisopropylethylamin (171 μ l, 1.0 mmol) zugetropft und die Reaktionslösung für 5 min gerührt. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hat tropft man das Dipeptid **326** (350 mg, 1.1 mmol) als Lösung in DMF (3.4 ml) zu. Danach wird in zwei Portionen PyBOP (729 mg, 1.4 mmol) zur Reaktionslösung gegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend verdünnt man die Reaktionslösung mit Diethylether (18.5 ml) und rührt für weitere 5 min. Folgend wird die organische Phase zuerst dreimal mit ges. NH_4Cl -Lsg. (12.0 ml) und dann mit Wasser (12.0 ml) gewaschen. Danach werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wird zweimal mit Diethylether (15.0 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat).

Tripeptid (543). Alken **470** (158 mg, 1.0 mmol) in DMF (3.4 ml), Diisopropylethylamin (171 μ l, 1.0 mmol), Dipeptid **326** (350 mg, 1.1 mmol) als Lösung in DMF (3.4 ml), PyBOP (729 mg, 1.4 mmol) Diethylether (18.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 325 mg (71%) **543** als weißen Feststoff.

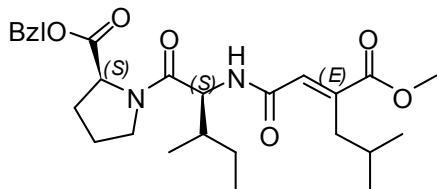


DC	$R_f = 0.20$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3271, 3064, 3035, 2963, 2932, 2876, 1746, 1716, 1666, 1626, 1536, 1499, 1447, 1384, 1364, 1323, 1265, 1217, 1170, 1120, 1030, 750, 698.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.86 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H), 0.99 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 1.10 – 1.16 (m, 2H), 1.30 (t, $J = 7.19$ Hz, 3H), 1.52 – 1.59 (m, 1H), 1.75 – 2.09 (m, 4H), 2.24 (d, $J = 1.61$ Hz, 3H), 3.68 – 3.70 (m, 1H), 3.84 – 3.87 (m, 1H), 4.22 (q, $J = 7.16$ Hz, 2H), 4.56 (dd, $J = 8.73, 4.70$ Hz, 1H), 4.70 (dd, $J = 9.00, 7.66$ Hz, 1H), 5.15 (d, $J = 3.63$ Hz, 2H), 6.40 (d, $J = 9.13$ Hz, 1H), 6.77 (q, $J = 1.34$ Hz, 1H, trans), 7.30 – 7.37 (m, 5H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 11.1, 13.9, 14.1, 15.2, 24.4, 24.9, 29.1, 38.0, 47.4, 54.6, 59.0, 61.4, 66.9, 128.1, 128.3, 128.6, 129.1, 135.6, 140.2, 165.2, 167.4, 170.7, 171.6.
MS (EI)	m/z 458 (M^+), 413, 346, 301, 274, 254, 226, 204, 189, 161, 149, 141, 97, 91, 85, 70, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{25}H_{34}N_2O_6$ (M^+)⁺ 458.2416; gef. 458.2420.

HPLC-ESI-MS m/z 459 ($M+H$)⁺, 481 ($M+Na$)⁺, 497 ($M+K$)⁺.

Tripeptid (544). Alken **471** (186 mg, 1.0 mmol) in DMF (3.4 ml), Diisopropylethylamin (171 µl, 1.0 mmol), Dipeptid **326** (350 mg, 1.1 mmol) als Lösung in DMF (3.4 ml), PyBOP (729 mg, 1.4 mmol) Diethylether (18.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 282 mg (58%) **544** als weißen Feststoff.



DC R_f = 0.22 (*n*-Hexan/EtOAc = 2:1).

IR ν_{max} (cm⁻¹) 3281, 3064, 3034, 2958, 2930, 2874, 1747, 1721, 1665, 1627, 1534, 1499, 1449, 1437, 1384, 1366, 1352, 1322, 1279, 1228, 1169, 1137, 749, 738.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; CDCl₃) 0.86 (dd, J = 6.85, 4.97 Hz, 6H), 0.89 (t, J = 7.45 Hz, 3H), 0.98 (d, J = 6.85 Hz, 3H), 1.02 – 1.17 (m, 2H), 1.52 – 1.57 (m, 1H), 1.75 – 1.85 (m, 3H), 1.95 – 2.03 (m, 3H), 2.16 – 2.24 (m, 1H), 2.67 (dd, J = 12.56, 7.05 Hz, 1H), 2.76 (dd, J = 12.56, 7.05 Hz, 1H), 3.67 – 3.72 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.83 – 3.90 (m, 1H), 4.54 – 4.57 (m, 1H), 4.69 – 4.73 (m, 1H), 5.16 (d, J = 4.16 Hz, 2H), 6.37 (d, J = 9.27 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H, *trans*), 7.28 – 7.36 (m, 5H).

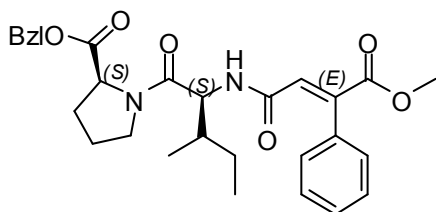
¹³C-NMR δ_C (100 MHz; CDCl₃) 11.1, 15.2, 22.2, 22.4, 24.4, 24.9, 28.4, 29.1, 35.7, 38.0, 47.4, 52.3, 54.6, 59.0, 66.9, 128.2, 128.3, 128.6, 129.9, 135.6, 143.5, 164.9, 168.0, 170.6, 171.6.

MS (EI) m/z 486 (M^+)⁺, 455, 430, 374, 342, 282, 254, 237, 206, 169, 137, 108, 79, 77.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{27}H_{38}N_2O_6$ (M^+)⁺ 486.2730; gef. 486.2726.

HPLC-ESI-MS m/z 487 ($M+H$)⁺, 509 ($M+Na$)⁺, 525 ($M+K$)⁺.

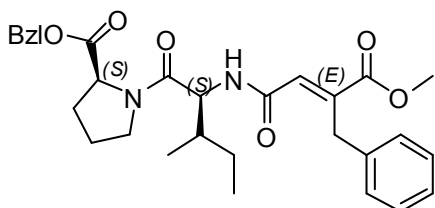
Tripeptid (546). Alken **472** (206 mg, 1.0 mmol) in DMF (3.4 ml), Diisopropylethylamin (171 µl, 1.0 mmol), Dipeptid **326** (350 mg, 1.1 mmol) als Lösung in DMF (3.4 ml), PyBOP (729 mg, 1.4 mmol) Diethylether (18.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 329 mg (65%) **546** als weißen Feststoff.



DC R_f = 0.24 (*n*-Hexan/EtOAc = 1:1).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3272, 3057, 3033, 2961, 2930, 2876, 1743, 1722, 1626, 1577, 1532, 1497, 1444, 1435, 1383, 1352, 1322, 1258, 1245, 1213, 1170, 1096, 1042, 1022, 750, 698.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 0.66 (t, J = 6.75 Hz, 3H), 0.75 (d, J = 6.58 Hz, 3H), 0.84 – 1.11 (m, 2H), 1.44 – 1.52 (m, 1H), 1.85 – 2.20 (m, 4H), 3.45 – 3.67 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 4.45 – 4.48 (m, 2H), 5.11 (d, J = 5.91 Hz, 2H), 6.05 (d, J = 7.79 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H, trans), 7.27 – 7.42 (m, 10H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 11.0, 14.9, 23.9, 24.8, 29.0, 37.6, 47.3, 52.8, 54.8, 58.9, 66.8, 128.1, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 129.0, 135.5, 139.0, 163.3, 166.8, 170.4, 171.6.
MS (EI)	m/z 506 (M ⁺) ⁺ , 450, 421, 342, 302, 274, 257, 214, 206, 189, 161, 147, 111, 102, 69, 45.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₉ H ₃₄ N ₂ O ₆ (M ⁺) ⁺ 506.2416; gef. 506.2422.
HPLC-ESI-MS	m/z 507 (M+H) ⁺ , 529 (M+Na) ⁺ , 545 (M+K) ⁺ .

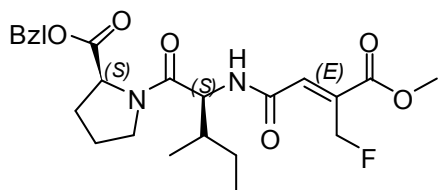
Tripeptid (547). Alken **473** (220 mg, 1.0 mmol) in DMF (3.4 ml), Diisopropylethylamin (171 μ l, 1.0 mmol), Dipeptid **326** (350 mg, 1.1 mmol) als Lösung in DMF (3.4 ml), PyBOP (729 mg, 1.4 mmol) Diethylether (18.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 374 mg (72%) **547** als weißen Feststoff.



DC	R_f = 0.24 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3279, 3084, 3061, 3030, 2961, 2932, 2876, 1746, 1721, 1665, 1625, 1536, 1494, 1453, 1436, 1383, 1352, 1322, 1272, 1238, 1213, 1182, 1170, 1089, 738, 698.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 0.85 (t, J = 7.39 Hz, 3H), 0.98 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.08 – 1.13 (m, 2H), 1.50 – 1.58 (m, 1H), 1.78 – 1.87 (m, 2H), 1.93 – 2.06 (m, 2H), 2.19 – 2.25 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.73 – 3.89 (m, 2H), 4.12 – 4.25 (m, 2H), 4.58 (dd, J = 8.66, 4.90 Hz, 1H), 4.69 – 4.75 (m, 1H), 5.15 (d, J = 5.37 Hz, 2H), 6.52 (d, J = 9.13 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H, trans), 7.13 – 7.22 (m, 3H), 7.27 – 7.37 (m, 7H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 11.1, 15.2, 24.4, 24.9, 29.1, 32.7, 38.0, 47.4, 52.4, 54.8, 59.0, 66.9, 126.2, 128.2, 128.3, 128.6, 128.8, 129.9, 135.5, 138.6, 142.3, 164.7, 167.2, 170.6, 171.6.

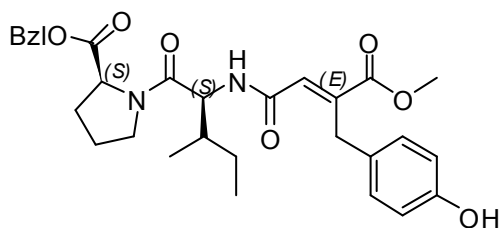
MS (EI)	m/z 520 (M^+), 489, 428, 400, 363, 315, 288, 274, 227, 202, 171, 131, 115, 97, 91, 70, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{30}H_{36}N_2O_6$ (M^+) ⁺ 520.2573; gef. 520.2583.
HPLC-ESI-MS	m/z 521 ($M+H$) ⁺ , 543 ($M+Na$) ⁺ , 559 ($M+K$) ⁺ .

Tripeptid (548). Alken **474** (81 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.7 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (175 mg, 0.55 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (364.5 mg, 0.7 mmol) Diethylether (9.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 117 mg (51%) **548** als weißen Feststoff.



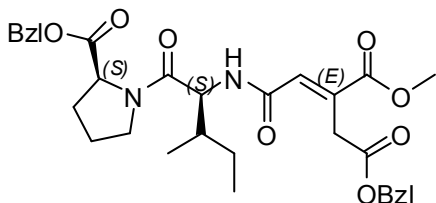
DC	R_f = 0.21 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3267, 3063, 3041, 2959, 2927, 2876, 2853, 1735, 1674, 1625, 1539, 1499, 1449, 1383, 1357, 1318, 1278, 1237, 1213, 1180, 1171, 1098, 1034, 955, 783, 745.
$^1\text{H-NMR}$	δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.77 (t, J = 7.39 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 0.99 – 1.15 – (m, 2H); 1.41 – 1.49 (m, 2H), 1.71 – 1.88 (m, 2H), 2.15 – 2.24 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.75 – 3.83 (m, 2H), 4.36 – 4.43 (m, 2H), 5.02 (s, 1H), 5.12 (d, J = 2.42 Hz, 2H), 5.14 (s, 1H), 6.40 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.28 – 7.34 (m, 5H), 8.66 (d, J = 8.87 Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 10.6, 14.6, 24.1, 24.5, 28.7, 36.2, 47.0, 52.0, 54.3, 58.6, 65.8, 81.2, 82.9, 126.4, 126.5, 127.8, 128.0, 128.4, 135.9, 138.1, 138.3, 156.9, 157.0, 162.7, 162.8, 169.9, 171.6.
MS (EI)	m/z 462 (M^+), 431, 406, 350, 318, 295, 258, 230, 204, 198, 162, 145, 135, 107, 91, 70, 52.
HRMS (EI)	m/z ber. für $C_{24}H_{31}F_1N_2O_6$ (M^+) ⁺ 462.2166; gef. 462.2165.
HPLC-ESI-MS	m/z 463 ($M+H$) ⁺ , 485 ($M+Na$) ⁺ , 501 ($M+K$) ⁺ .

Tripeptid (549). Alken **476** (118 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.7 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (175 mg, 0.55 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (364.5 mg, 0.7 mmol) Diethylether (9.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 96 mg (36%) **549** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.17$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3275, 3064, 3034, 2957, 2927, 2875, 2856, 1744, 1722, 1623, 1606, 1533, 1513, 1447, 1381, 1353, 1265, 1215, 1170, 1103, 846, 839.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.79 (t, $J = 7.46$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.06 – 1.15 (m, 2H), 1.41 – 1.51 (m, 2H), 1.76 – 1.93 (m, 3H), 2.14 – 2.25 (m, 2H), 3.36 – 3.52 (m, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.96 (d, $J = 13.16$ Hz, 1H), 4.08 (d, $J = 13.30$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J = 8.53, 5.04$ Hz, 1H), 4.46 (t, $J = 8.80$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 2.15$ Hz, 2H), 6.30 s, 1H, <i>trans</i>), 6.60 (d, $J = 8.46$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 8.46$ Hz, 2H), 7.25 – 7.36 (m, 5H), 8.79 (d, $J = 8.46$ Hz, 1H), 9.14 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 10.6, 14.6, 24.3, 24.6, 28.7, 30.8, 36.0, 47.0, 52.2, 54.4, 58.6, 65.8, 114.9, 115.3, 127.8, 128.0, 128.4, 129.5, 130.1, 135.9, 141.4, 155.6, 164.4, 167.2, 169.9, 171.6.
MS (EI)	m/z 536 (M ⁺), 505, 423, 391, 331, 319, 279, 228, 218, 206, 164, 131, 91, 70, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₃₀ H ₃₆ N ₂ O ₇ (M ⁺) ⁺ 536.2522; gef. 536.2521.
HPLC-ESI-MS	m/z 537 (M+H) ⁺ , 559 (M+Na) ⁺ .

Tripeptid (550). Alken **475** (139 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.7 ml), Diisopropylethylamin (85.5 µl, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (175 mg, 0.55 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (364.5 mg, 0.7 mmol) Diethylether (9.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 118 mg (41%) **550** als weißen Feststoff.



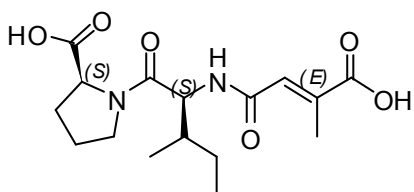
DC	$R_f = 0.26$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3276, 3089, 3063, 3034, 2961, 2933, 2877, 1739, 1724, 1667, 1624, 1537, 1499, 1455, 1437, 1382, 1352, 1325, 1284, 1213, 1167, 1097, 1003, 748, 739, 698.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; CDCl ₃) 0.84 (t, $J = 7.25$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.06 – 1.13 (m, 1H), 1.50 – 1.57 (m, 1H), 1.78 – 1.85 (m, 1H), 1.94 – 2.03 (m, 2H), 2.18 – 2.26 (m, 2H), 3.64 – 3.68 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.80 – 3.86 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 4.57 (dd, $J = 8.87, 4.57$ Hz, 1H), 4.64 – 4.69 (m, 1H), 5.13 (s, 2H), 5.15 (d, $J = 4.57$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 8.87$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.27 – 7.36 (m, 10H).

^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 11.1, 15.1, 24.5, 24.9, 29.1, 33.0, 37.9, 47.4, 52.6, 54.9, 59.1, 66.7, 66.9, 128.1, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6, 132.1, 135.5, 135.8, 135.9, 164.3, 166.7, 170.5, 170.6, 171.6.
MS (EI)	m/z 578 (M^+), 522, 466, 411, 374, 346, 301, 238, 204, 176, 153, 127, 107, 91, 86, 70.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 578.2628; gef. 578.2625.
HPLC-ESI-MS	m/z 579 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 601 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 617 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Entschützung der Tripeptide (551 – 557)

Zu einer Lösung von Tripeptid (1.0 mmol, 1.0 eq) in THF (0.6 ml/0.1 mmol) wird bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre (Argon) über eine Spritzenpumpe (1.0 ml/0.75 h) eine 0.5 M Lithiumhydroxid-Lsg. (6.0 ml, 3.0 mmol, 3.0 eq) zugetropft. Nach 3 - 4 h Reaktionszeit (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung mit 1 M HCl-Lsg. auf pH 2 – 3 titriert und für weitere 5 min gerührt. Die trübe Lösung wird dreimal mit Ethylacetat (30.0 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und abfiltriert. Das Rohprodukt wird mittels Diethylether oder *n*-Hexan ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert und mit Diethylether (15.0 ml) oder *n*-Hexan (15.0 ml) gewaschen. Das Produkt wird zuerst am Hochvakuum für 24 h getrocknet, anschließend in Methanol aufgenommen, mit Wasser ausgefällt und lyophilisiert. Nach zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser gefolgt von Methanol/Wasser erhält man einen sauberen weißen Feststoff. Einzelne Tripeptide wurden für die biologische Testierung noch zusätzlich mittels präparativer HPLC (t_{R} = 9.0 min [15% bis 50% CH_3CN in 30 min]) gereinigt.

Tripeptid (551). Tripeptid **543** (229 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) in THF (3.0 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H_2O (3.0 ml, 1.5 mmol, 3.0 eq). Die



Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 115 mg (68%) **551** als weißen Feststoff.

IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3275, 2965, 2932, 2878, 2611, 1717, 1657, 1613, 1542, 1455, 1384, 1364, 1323, 1260, 1224, 1187, 1174.
^1H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.84 (t, J = 7.42 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.02 – 1.17 (m, 2H), 1.87 – 2.09 (m, 4H), 2.14 (d, J = 1.21 Hz, 3H), 2.19 – 2.32 (m, 1H), 3.54 (t, J = 7.32 Hz, 1H), 3.59 – 3.77 (m, 2H),

4.60 (dd, $J = 8.06, 4.43$ Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.10 (s, 1H, *trans*), 9.32 (br s, 1H), 9.36 (br s, 1H).

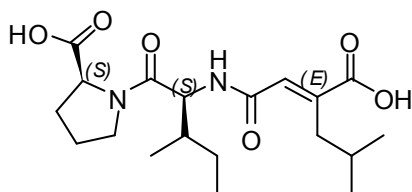
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 10.3, 11.0, 14.1, 24.4, 29.7, 36.7, 47.7, 56.5, 59.1, 127.0, 138.7, 166.4, 171.0, 173.9, 174.6.

MS (CI) m/z 341 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 323, 284, 264, 226, 206, 198, 156, 131, 116, 91, 79.

HRMS (CI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 341.1712; gef. 341.1711.

HPLC-ESI-MS m/z 341 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 363 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 391 ($\text{M}+\text{K}$)⁺.

Tripeptid (552). Tripeptid **544** (243 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) in THF (3.0 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H_2O (3.0 ml, 1.5 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 82 mg (58%) **552** als weißen Feststoff.



IR ν_{max} (cm^{-1}) 3275, 2960, 2928, 2875, 2608, 1714, 1608, 1540, 1465, 1454, 1384, 1367, 1272, 1224, 1194, 1166, 1147.

^1H -NMR δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.85 (t, $J = 7.23$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 5.24$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 4.84$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 1.07 – 1.15 (m, 2H), 1.52 – 1.56 (m, 1H), 1.75 – 2.03 (m, 3H), 2.19 – 2.24 (m, 1H), 2.67 (dd, $J = 12.56, 7.05$ Hz, 1H), 2.76 (dd, $J = 12.56, 7.06$ Hz, 1H), 3.65 – 3.71 (m, 1H), 3.81 – 3.87 (m, 1H), 4.56 (dd, $J = 8.60, 4.70$ Hz, 1H), 4.72 (t, $J = 7.66$ Hz, 1H), 6.37 (d, $J = 9.27$ Hz, 1H), 6.77 (s, 1H, *trans*), 8.05 (br s, 1H), 8.11 (br s, 1H).

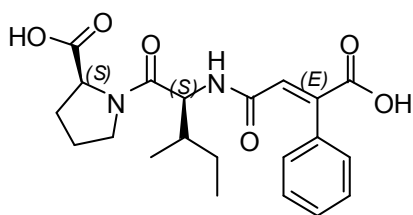
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 11.4, 15.5, 22.5, 22.8, 24.7, 25.2, 28.8, 29.4, 36.0, 38.4, 47.7, 54.9, 59.3, 130.3, 143.9, 165.2, 170.9, 171.9, 175.7.

MS (EI) m/z 382 (M^+)⁺, 367, 326, 287, 267, 240, 223, 194, 167, 155, 137, 116, 86, 70, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+)⁺ 368.2675; gef. 368.2669.

HPLC-ESI-MS m/z 383 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 405 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 421 ($\text{M}+\text{K}$)⁺.

Tripeptid (553). Tripeptid **546** (253 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) in THF (3.0 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (3.0 ml, 1.5 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 157 mg (78%) **553** als weißen Feststoff.



IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3274, 3061, 3030, 2966, 2933, 2878, 2600, 1717, 1664, 1608, 1541, 1494, 1453, 1269, 1222, 1191, 699.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-d₆) 0.71 (t, J = 7.39 Hz, 3H), 0.80 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 0.86 – 0.91 (m, 1H), 1.23 – 1.29 (m, 1H), 1.63 – 1.89 (m, 4H), 2.06 – 2.12 (m, 1H), 3.45 – 3.50 (m, 1H), 3.62 – 3.68 (m, 1H), 4.18 (dd, J = 8.87, 4.57 Hz, 1H), 4.23 (t, J = 8.93 Hz, 1H), 4.48 (s, 1H), 7.06 (s, 1H, *trans*), 7.14 – 7.16 (m, 2H), 7.25 – 7.27 (m, 3H). 8.42 (br s, 1H), 8.44 (br s, 1H).

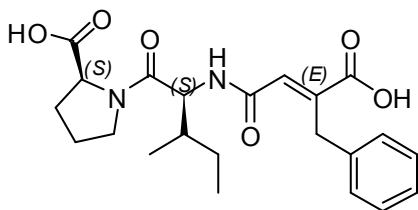
¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO-d₆) 10.6, 14.6, 24.0, 24.4, 28.7, 35.9, 46.8, 54.1, 58.5, 126.4, 127.3, 127.5, 129.2, 134.9, 139.4, 164.3, 167.9, 169.6, 173.2.

MS (EI) m/z 402 (M⁺), 346, 302, 286, 260, 243, 204, 175, 147, 131, 103, 86, 70.

HRMS (EI) m/z ber. für C₂₁H₂₆N₂O₆ (M⁺) 402.1790; gef. 402.1789.

HPLC-ESI-MS m/z 403 (M+H)⁺, 425 (M+Na)⁺, 441 (M+K)⁺.

Tripeptid (554). Tripeptid **547** (260 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) in THF (3.0 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (3.0 ml, 1.5 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 156 mg (75%) **554** als weißen Feststoff.

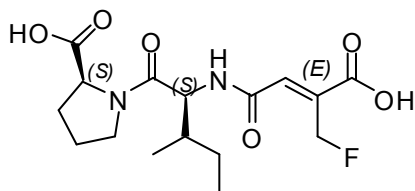


IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3274, 3061, 3030, 2966, 2933, 2878, 2600, 1717, 1664, 1541, 1494, 1453, 1269, 1222, 1191, 699.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-d₆) 0.82 (t, J = 7.39 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.07 – 1.16 (m, 1H), 1.47 – 1.54 (m, 1H), 1.77 – 1.93 (m, 4H), 2.09 – 2.19 (m, 1H), 3.57 – 3.65 (m, 1H), 3.82 – 3.88 (m, 1H), 4.06 (d, J = 13.30 Hz, 1H), 4.19 (d, J = 13.30 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 8.53, 4.77

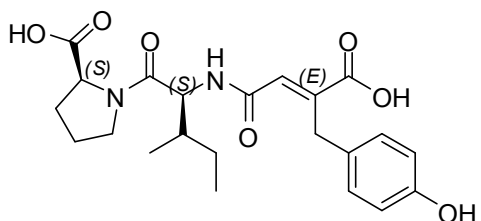
	Hz, 1H), 4.46 (t, $J = 8.87$ Hz, 1H), 5.11 (d, $J = 2.82$ Hz, 1H), 7.02 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.11 – 7.23 (m, 5H), 8.73 (br s, 1H), 8.76 (br s, 1H).
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.6, 14.7, 24.3, 24.5, 28.8, 31.7, 36.0, 46.9, 54.4, 58.5, 125.9, 127.8, 128.1, 128.5, 139.4, 142.1, 164.7, 168.3, 169.8, 173.3.
MS (ESI)	m/z 416 (M^+), 391, 315, 301, 274, 257, 230, 206, 188, 154, 145, 116, 86, 70, 57.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+) ⁺ 416.1947; gef. 416.1951.
HPLC-ESI-MS	m/z 417 ($M+H$) ⁺ , 439 ($M+Na$) ⁺ , 455 ($M+K$) ⁺ .

Tripeptid (555). Tripeptid **548** (46 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) in THF (0.6 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H_2O (0.6 ml, 0.3 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (1.5/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1.5/10). Man erhält 24 mg (65%) **555** als weißen Feststoff.



IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3284, 2929, 2876, 2854, 1735, 1674, 1625, 1539, 1451, 1279, 1236, 1211, 1184, 1172, 1098, 743.
^1H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.80 (t, $J = 7.23$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.06 – 1.13 (m, 2H), 1.46 – 1.49 (m, 1H), 1.76 – 1.93 (m, 3H), 2.17 – 2.24 (m, 1H), 3.49 – 3.64 (m, 1H), 3.77 – 3.83 (m, 1H), 4.37 – 4.45 (m, 2H), 5.03 (dd, $J = 8.70, 4.33$ Hz, 1H), 5.13 (t, $J = 8.80$ Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 7.34 (s, 1H, <i>trans</i>), 7.96 (br s, 1H), 13.59 (br s, 1H).
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.6, 14.5, 24.2, 24.6, 28.7, 36.2, 47.0, 54.8, 58.6, 65.8, 70.3, 128.3, 128.4, 144.8, 145.0, 160.4, 160.6, 163.8, 164.0, 171.5, 176.1.
MS (EI)	m/z 357 ($M-H$) ⁺ , 329, 325, 297, 269, 244, 230, 217, 204, 188, 154, 135, 129, 119, 107, 70, 52.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{F}_1\text{N}_2\text{O}_6$ ($M-H$) ⁺ 357.1456; gef. 357.1458.
HPLC-ESI-MS	m/z 359 ($M+H$) ⁺ , 381 ($M+Na$) ⁺ , 397 ($M+K$) ⁺ .

Tripeptid (556). Tripeptid **549** (54 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) in THF (0.6 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.6 ml, 0.3 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 19 mg (45%) **556** als weißen Feststoff.



IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3275, 3064, 3034, 2957, 2927, 2856, 1744, 1722, 1623, 1606, 1513, 1447, 1265, 1215, 1170, 1103, 846, 839.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-d₆) 0.79 (t, J = 7.39 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.03 – 1.16 (m, 2H), 1.43 – 1.53 (m, 1H), 1.75 – 1.95 (m, 3H), 2.16 – 2.32 (m, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.94 (d, J = 13.16 Hz, 1H), 4.07 (d, J = 13.16 Hz, 1H), 4.39 (dd, J = 8.06, 5.10 Hz, 1H), 4.45 (t, J = 8.87 Hz, 1H), 5.11 (d, J = 2.15 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 8.33 Hz, 2H), 6.78 (s, 1H, *trans*), 6.96 (d, J = 7.79 Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 9.13 (br s, 1H). 13.43 (br s, 1H).

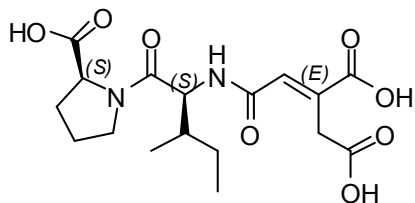
¹³C-NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO-d₆) 10.6, 14.6, 24.3, 24.7, 28.6, 31.3, 36.0, 47.0, 54.3, 61.0, 114.9, 127.8, 128.4, 129.6, 142.4, 155.9, 162.6, 168.1, 169.9, 174.8.

MS (ESI) m/z 433 (M+H)⁺, 353, 312, 295, 283, 254, 227, 199, 182, 169, 138, 113, 86, 71, 57.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₂₂H₂₉N₂O₇ (M+H)⁺ 433.3233; gef. 433.3269.

HPLC-ESI-MS m/z 433 (M+H)⁺, 455 (M+Na)⁺, 471 (M+K)⁺.

Tripeptid (557). Tripeptid **550** (58 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) in THF (0.6 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (1.2 ml, 0.6 mmol, 6.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (3/10) gefolgt von Methanol/Wasser (3/10). Man erhält 23 mg (58%) **557** als weißen Feststoff.



IR ν_{\max} (cm⁻¹) 2964, 2929, 2877, 1739, 1721, 1684, 1649, 1536, 1498, 1455, 1214, 1191.

¹H-NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO-d₆) 0.73 (t, J = 7.32 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.45 Hz, 3H), 1.01 (d, J = 6.45 Hz, 1H), 1.09 (d, J = 6.45 Hz, 1H), 1.39 – 1.61 (m, 1H), 1.90 (dd, J = 13.84, 6.58 Hz, 2H), 1.93 – 2.30 (m, 2H), 3.15 –

3.26 (m, 2H), 3.71 – 3.85 (m, 1H), 4.18 – 4.45 (m, 1H), 5.08 – 5.11 (m, 1H), 5.24 (d, $J = 2.96$ Hz, 1H), 5.81 (br s, 1H), 6.71 (s, 1H, *trans*), 8.77 (br s, 1H).

^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.9, 14.5, 23.0, 24.5, 27.7, 32.2, 36.7, 45.6, 55.6, 58.7, 128.5, 142.6, 162.0, 168.8, 171.6, 171.9, 175.4.

MS (ESI) m/z 407 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 371, 319, 309, 270, 206, 136.

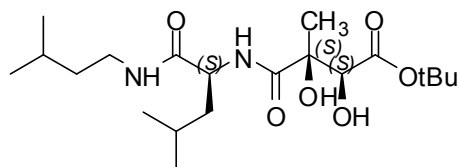
HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_1$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 407.1424; gef. 407.1422.

HPLC-ESI-MS m/z 385 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 407 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 423 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der Tripeptide (558 – 565)

Zu einer Lösung von (*S,S*)- oder (*R,R*)-Diol (1.0 mmol) in DMF (8.5 ml) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Diisopropylethylamin (171 μl , 1.0 mmol) zugetropft und die Reaktionslösung für 10 min gerührt. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hat tropft man das Dipeptid **321** (240 mg, 1.2 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (5.42 ml) zu. Anschließend gibt man in zwei Portionen über einen Zeitraum von 10 min PyBOP (572 mg, 1.1 mmol) zur Reaktionslösung und rührt für weitere 12 h bei Raumtemperatur. Danach verdünnt man die Reaktionslösung mit Diethylether (45.0 ml) und rührt für weitere 10 min. Daraufhin wird die organische Phase dreimal mit ges. NH_4Cl -Lsg. (40.0 ml) gewaschen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit Diethylether (30.0 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat).

Tripeptid (558). (*S,S*)-Diol **501** (110 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.25 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μl , 0.5 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (286 mg, 0.55 mmol) Diethylether (30.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 116 mg (58%) **558** als weißen Feststoff.



DC $R_f = 0.28$ (*n*-Hexan/EtOAc = 3:1).

Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +23.1$ ($c = 0.11$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3310, 3098, 2957, 2927, 2871, 2855, 1729, 1647, 1537, 1468, 1458, 1386, 1369, 1284, 1257, 1161, 1121, 1079.

^1H -NMR δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.88 (d, $J = 6.45$ Hz, 6H), 0.92 (d, $J = 6.04$ Hz, 6H), 1.03 – 1.15 (m, 1H), 1.36 (q, $J = 7.25$ Hz, 2H), 1.47 (s, 3H), 1.49

(s, 9H), 1.54 – 1.73 (m, 5H), 3.21 – 3.25 (m, 2H), 4.17 (s, 1H, (S)), 4.32 – 4.42 (m, 1H), 6.43 (s, 1H), 7.05 (d, $J = 7.39$ Hz, 1H), 7.61 (br s, 1H), 7.92 (br s, 1H).

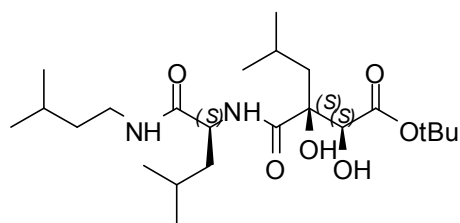
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 21.8, 22.4, 22.5, 22.9, 23.1, 24.8, 25.8, 28.0, 29.7, 38.2, 40.6, 51.8, 75.4, 76.0, 83.8, 171.5, 172.2, 175.1.

MS (EI) m/z 402 (M^+), 372, 346, 301, 257, 232, 190, 181, 149, 125, 111, 97, 86, 71, 57, 43.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+)⁺ 402.2729; gef. 402.2726.

HPLC-ESI-MS m/z 403 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 425 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 441 ($\text{M}+\text{K}$)⁺.

Tripeptid (559). (*S,S*)-Diol **502** (131 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.25 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μl , 0.5 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (286 mg, 0.55 mmol) Diethylether (22.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 115 mg (52%) **559** als weißen Feststoff.



DC $R_f = 0.31$ (*n*-Hexan/EtOAc = 1:1).

Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +35.8$ ($c = 0.18$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3299, 3097, 2956, 2928, 2870, 1715, 1643, 1536, 1468, 1438, 1386, 1368, 1308, 1284, 1258, 1232, 1170, 1158, 1090.

^1H -NMR δ_{H} (400 MHz; CDCl_3) 0.89 (d, $J = 6.58$ Hz, 12H), 0.92 (d, $J = 6.45$ Hz, 6H), 1.02 – 1.15 (m, 1H), 1.36 (q, $J = 7.25$ Hz, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.50 – 1.60 (m, 2H), 1.71 – 1.84 (m, 4H), 3.19 – 3.26 (m, 2H), 4.01 (s, 1H (S)), 4.23 – 4.31 (m, 1H), 5.99 (br s, 1H), 7.27 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 9.13$ Hz, 1H), 8.01 (br s, 1H).

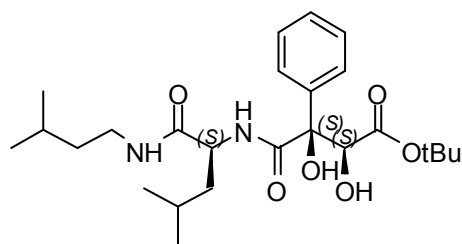
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 22.0, 22.2, 22.4, 22.5, 22.8, 22.9, 23.9, 24.4, 25.6, 29.7, 37.9, 38.3, 40.6, 44.9, 51.8, 73.3, 76.9, 84.7, 170.5, 174.3, 176.9.

MS (ESI) m/z 445 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 358, 330, 171.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 445.3272; gef. 444.3248.

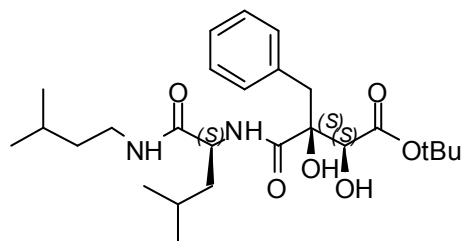
HPLC-ESI-MS m/z 445 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 467 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 483 ($\text{M}+\text{K}$)⁺.

Tripeptid (560). (*S,S*)-Diol **503** (141 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.25 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (286 mg, 0.55 mmol) Diethylether (20.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 146 mg (63%) **560** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.26$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +47.9$ ($c = 0.17$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3310, 3095, 3068, 2957, 2929, 2870, 1727, 1645, 1527, 1469, 1450, 1386, 1368, 1342, 1281, 1258, 1232, 1158, 1130, 1092, 1071, 698.
$^1\text{H-NMR}$	δ_H (400 MHz; CDCl_3) 0.88 (d, $J = 6.45$ Hz, 6H), 0.92 (d, $J = 6.58$ Hz, 6H), 1.03 – 1.12 (m, 1H), 1.36 (d, $J = 13.27$, 6.51 Hz, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.50 – 1.79 (m, 3H), 3.12 – 3.23 (m, 2H), 4.19 (s, 1H, (S)), 4.30 – 4.37 (m, 1H), 5.90 (br s, 1H), 6.02 (br s, 1H), 7.30 – 7.36 (m, 3H), 7.42 (d, $J = 7.25$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 5.91$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 6.98$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_C (100 MHz; CDCl_3) 21.7, 22.0, 22.8, 22.9, 24.6, 25.7, 27.7, 37.8, 38.2, 40.8, 51.6, 75.0, 78.2, 84.6, 125.9, 126.1, 128.5, 138.4, 170.7, 174.5, 175.4.
MS (EI)	m/z 464 (M^+), 408, 393, 363, 334, 294, 258, 248, 227, 201, 185, 164, 144, 105, 86, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+) ⁺ 464.2886; gef. 464.2887.
HPLC-ESI-MS	m/z 465 ($M+H$) ⁺ , 487 ($M+Na$) ⁺ , 504 ($M+K$) ⁺ .

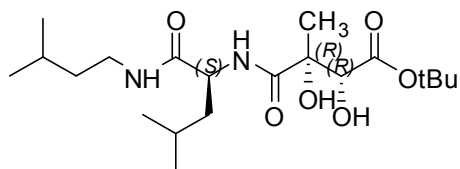
Tripeptid (561). (*S,S*)-Diol **504** (148 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.25 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (286 mg, 0.55 mmol) Diethylether (18.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 131 mg (63%) **561** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.35$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +29.7$ ($c = 0.09$, MeOH).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3307, 3088, 3065, 3032, 2956, 2931, 2870, 1716, 1644, 1532, 1496, 1469, 1455, 1437, 1386, 1368, 1282, 1258, 1232, 1158, 1096, 700.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 0.86 (d, J = 6.58 Hz, 6H), 0.89 (d, J = 6.85 Hz, 6H), 1.08 – 1.19 (m, 1H), 1.33 (dd, J = 7.32, 2.48 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.43 – 1.71 (m, 4H), 3.05 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.14 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.17 – 3.25 (m, 2H), 3.87 (s, 1H, [S]), 4.26 (dd, J = 15.65, 6.78 Hz, 1H), 5.85 (br s, 1H), 6.08 (br s, 1H), 7.21 – 7.24 (m, 3H), 7.27 (d, J = 9.13 Hz, 1H), 7.31 – 7.35 (m, 2H), 7.48 (d, J = 8.46 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 22.0, 22.2, 22.7, 22.9, 24.6, 25.8, 27.8, 37.9, 38.3, 40.7, 42.2, 51.7, 72.2, 79.5, 83.8, 127.1, 128.1, 130.9, 134.6, 170.4, 174.6, 176.6.
MS (EI)	m/z 478 (M ⁺) ⁺ , 422, 386, 377, 366, 331, 308, 273, 262, 258, 246, 232, 196, 144, 111, 97, 91, 86, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₆ H ₄₂ N ₂ O ₆ (M ⁺) ⁺ 478.3042; gef. 478.3040.
HPLC-ESI-MS	m/z 479 (M+H) ⁺ , 501 (M+Na) ⁺ , 517 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (562). (*R,R*)-Diol **505** (110 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.25 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (286 mg, 0.55 mmol) Diethylether (30.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 106 mg (53%) **562** als weißen Feststoff.

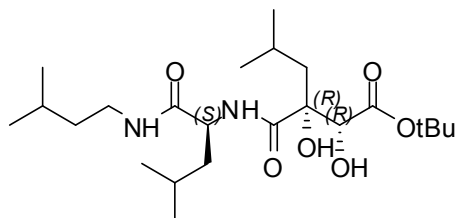


DC	R_f = 0.30 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -19.2 (c = 0.13, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3339, 3099, 2957, 2931, 2871, 2856, 2721, 1733, 1647, 1526, 1469, 1457, 1393, 1387, 1369, 1257, 1240, 1158, 1106, 746.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 0.88 (d, J = 6.45 Hz, 6H), 0.93 (d, J = 6.04 Hz, 6H), 1.02 – 1.14 (m, 1H), 1.36 (q, J = 7.25 Hz, 2H), 1.47 (s, 3H), 1.49 (s, 9H), 1.52 – 1.72 (m, 5H), 3.22 – 3.26 (m, 2H), 4.15 (s, 1H, (<i>R</i>)), 4.31 – 4.40 (m, 1H), 6.41 (s, 1H), 7.05 (d, J = 7.39 Hz, 1H), 7.60 (br s, 1H), 7.90 (br s, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 21.5, 22.4, 22.5, 22.9, 23.0, 24.9, 25.8, 28.0, 38.0, 38.1, 40.3, 51.7, 75.8, 76.6, 83.9, 171.8, 171.9, 174.9.
MS (EI)	m/z 402 (M ⁺) ⁺ , 346, 301, 232, 201, 186, 142, 119, 107, 86, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{20}H_{38}N_2O_6$ (M^+)⁺ 402.2729; gef. 402.2721.

HPLC-ESI-MS m/z 403 ($M+H$)⁺, 425 ($M+Na$)⁺, 441 ($M+K$)⁺.

Tripeptid (563). (*R,R*)-Diol **506** (131 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.25 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (286 mg, 0.55 mmol) Diethylether (27.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 95 mg (43%) **563** als weißen Feststoff.



DC R_f = 0.32 (*n*-Hexan/EtOAc = 1:1).

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ = -37.3 (c = 0.15, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3302, 3098, 2957, 2928, 2870, 1715, 1644, 1538, 1468, 1438, 1388, 1368, 1309, 1284, 1257, 1232, 1170, 1158, 1091.

1H -NMR δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 0.88 (d, J = 6.58 Hz, 12H), 0.92 (d, J = 6.45 Hz, 6H), 1.03 – 1.14 (m, 1H), 1.37 (q, J = 7.25 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.51 – 1.60 (m, 2H), 1.72 – 1.84 (m, 4H), 3.20 – 3.26 (m, 2H), 4.01 (s, 1H (*R*)), 4.25 – 4.31 (m, 1H), 5.98 (br s, 1H), 7.27 (d, J = 8.60 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 9.13 Hz, 1H), 8.02 (br s, 1H).

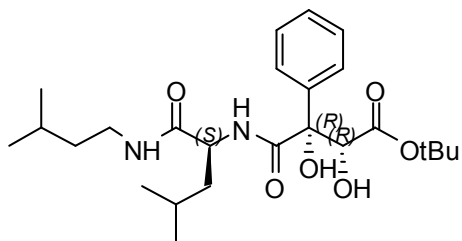
^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 22.0, 22.2, 22.4, 22.5, 22.8, 22.9, 23.7, 24.7, 25.8, 31.5, 37.9, 38.0, 40.6, 44.9, 51.8, 73.3, 76.9, 84.9, 170.4, 174.3, 176.9.

MS (ESI) m/z 445 ($M+H$)⁺, 411, 358, 330, 274, 214, 173, 158.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{23}H_{45}N_2O_6$ ($M+H$)⁺ 445.3272; gef. 445.3250.

HPLC-ESI-MS m/z 445 ($M+H$)⁺, 467 ($M+Na$)⁺, 483 ($M+K$)⁺.

Tripeptid (564). (*R,R*)-Diol **507** (141 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.25 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (286 mg, 0.55 mmol) Diethylether (21.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 134 mg (58%) **564** als weißen Feststoff.

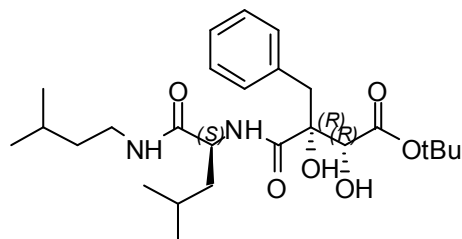


DC R_f = 0.28 (*n*-Hexan/EtOAc = 1:1).

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ = -47.2 (c = 0.18, MeOH).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3312, 3119, 3069, 3028, 303, 2955, 2930, 2869, 1739, 1644, 1601, 1560, 1530, 1468, 1450, 1392, 1387, 1368, 1307, 1294, 1259, 1243, 1195, 1160, 1134, 1104, 697.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 0.86 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.45 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.72 Hz, 6H), 1.07 (s, 9H), 1.32 – 1.49 (m, 4H), 1.52 – 1.64 (m, 2H), 3.11 – 3.29 (m, 2H), 4.36 – 4.42 (m, 1H), 4.18 (s, 1H, [R]), 6.86 (br s, 1H), 7.24 – 7.32 (m, 5H), 7.40 (br s, 1H), 7.66 (d, J = 1.64 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 1.64 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl ₃) 21.6, 22.5, 22.5, 22.8, 24.6, 25.8, 27.4, 38.0, 38.1, 40.6, 51.9, 75.2, 80.6, 82.7, 125.7, 127.7, 127.8, 137.4, 171.1, 172.0, 172.8.
MS (EI)	m/z 464 (M ⁺) ⁺ , 449, 421, 393, 363, 333, 322, 294, 248, 227, 220, 185, 164, 142, 135, 105, 86, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₅ H ₄₀ N ₂ O ₆ (M ⁺) ⁺ 464.2886; gef. 464.2867.
HPLC-ESI-MS	m/z 465 (M+H) ⁺ , 487 (M+Na) ⁺ , 503 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (565). (*R,R*)-Diol **508** (148 mg, 0.5 mmol) in DMF (4.25 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **321** (120 mg, 0.6 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (2.71 ml), PyBOP (286 mg, 0.55 mmol) Diethylether (17.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 114 mg (48%) **565** als weißen Feststoff.



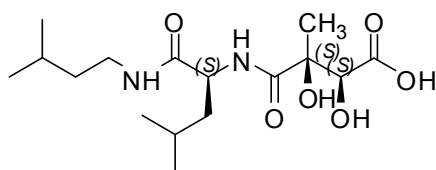
DC	R_f = 0.33 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -28.8 (c = 0.08, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3304, 3107, 3088, 3064, 3032, 2956, 2928, 2870, 2855, 2721, 1727, 1645, 1537, 1496, 1469, 1455, 1440, 1386, 1369, 1342, 1253, 1158, 1105, 1078, 1033, 700.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; CDCl ₃) 0.86 (d, J = 6.58 Hz, 6H), 0.89 (d, J = 6.85 Hz, 6H), 1.07 – 1.18 (m, 1H), 1.30 (dd, J = 7.32, 2.48 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.45 – 1.71 (m, 4H), 3.03 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.16 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.18 – 3.25 (m, 2H), 3.89 (s, 1H, [R]), 4.28 (dd, J = 15.65, 6.78 Hz, 1H), 5.85 (br s, 1H), 6.09 (br s, 1H), 7.20 – 7.24 (m, 3H), 7.27 (d, J = 9.13 Hz, 1H), 7.30 – 7.35 (m, 2H), 7.50 (d, J = 8.46 Hz, 1H).

^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; CDCl_3) 21.7, 22.3, 22.4, 23.0, 24.6, 25.8, 27.8, 29.7, 38.1, 38.2, 40.5, 51.7, 74.8, 79.7, 84.0, 127.0, 128.0, 130.5, 135.1, 171.6, 172.5, 173.2.
MS (ESI)	m/z 479 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 423, 336, 261, 195.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ 479.3110; gef. 444.3115.
HPLC-ESI-MS	m/z 479 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 501 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 517 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Entschützung der Tripeptide (566 – 573)

Zu einer Lösung von (*S,S*)-Diol- oder (*R,R*)-Diol-Tripeptid (0.25 mmol) in DCM (8.0 mmol, 0.5 ml) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Triisopropylsilan (0.625 mmol, 128 μl) zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 10 min gerührt und danach Trifluoressigsäure (3.25 mmol, 256 μl) über eine Spritzenpumpe (0.5 ml/0.5 h) zugesetzt und für weitere 2 – 4 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Diethylether oder *n*-Hexan ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Diethylether (8.0 ml) oder *n*-Hexan (8.0 ml) gewaschen. Das Produkt wird zuerst am Hochvakuum für 24 h getrocknet, dann in Acetonitril aufgenommen, mit Wasser ausgefällt und lyophilisiert. Nach zweimaliger Lyophilisation aus CH_3CN /Wasser gefolgt von Methanol/Wasser erhält man einen sauberen weißen Feststoff. Einzelne Tripeptide wurden für die biologische Testierung noch zusätzlich mittels präparativer HPLC (t_{R} = 9.0 min [15% bis 50% CH_3CN in 30 min]) gereinigt.

Tripeptid (566). (*S,S*)-Diol-Tripeptid **558** (80 mg, 0.20 mmol), Triisopropylsilan (103 μl , 0.5

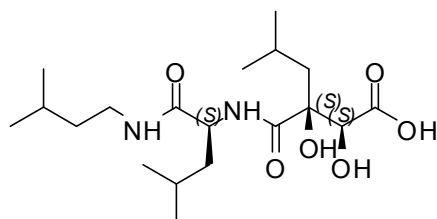


mmol), Trifluoressigsäure (205 μl , 2.6 mmol), DCM (0.4 ml, 6.4 mmol)). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 53 mg (73%) **566** als weißen Feststoff.

Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +33.3$ (c = 0.12, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3331, 3148, 3100, 2958, 2932, 2872, 1729, 1650, 1528, 1458, 1394, 1370, 1258, 1238, 1156, 1107.
^1H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.84 (t, J = 5.78 Hz, 12H), 0.97 – 1.10 (m, 1H), 1.27 (s, 3H), 1.37 (q, J = 7.30 Hz, 2H), 1.44 – 1.63 (m, 3H), 3.00 – 3.10 (m, 2H), 4.03 (s, 1H), 4.20 – 4.33 (m, 1H), 5.00 (br s, 1H), 5.42 (br s, 1H), 5.93 (br s, 1H), 7.45 – 7.55 (m, 1H), 7.86 – 7.99 (m, 1H).

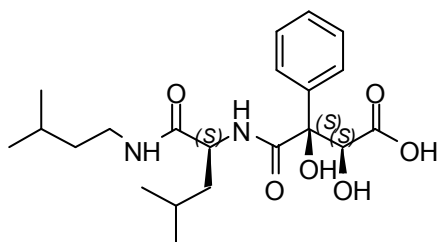
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.9, 22.3, 22.4, 22.7, 23.0, 24.0, 25.1, 36.7, 37.9, 41.6, 51.0, 75.3, 76.1, 170.3, 171.3, 173.0.
MS (EI)	m/z 346 (M^+), 331, 301, 271, 232, 201, 186, 158, 142, 119, 107, 90, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+) ⁺ 346.2104; gef. 346.2105.
HPLC-ESI-MS	m/z 347 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 369 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 385 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (567). (S,S)-Diol-Tripeptid **559** (89 mg, 0.20 mmol), Triisopropylsilan (103 μl , 0.5 mmol), Trifluoressigsäure (205 μl , 2.6 mmol), DCM (0.4 ml, 6.4 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 47 mg (61%) **567** als weißen Feststoff.



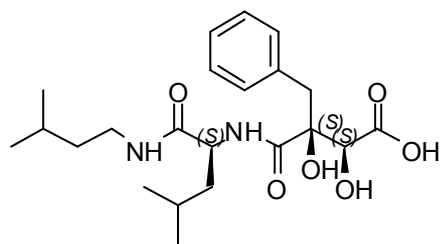
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +28.8$ ($c = 0.13$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3302, 3092, 2956, 2928, 2871, 1737, 1643, 1536, 1468, 1386, 1368, 1227, 1170, 1158, 1096.
^1H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.84 (dd, $J = 6.65, 3.29$ Hz, 12H), 0.93 (d, $J = 6.85$ Hz, 6H), 1.26 (q, $J = 7.30$ Hz, 2H), 1.37 – 1.46 (m, 3H), 1.54 – 1.60 (m, 2H), 1.74 – 1.78 (m, 1H), 1.89 – 1.96 (m, 1H), 3.01 – 3.09 (m, 2H), 4.08 (s, 1H), 4.27 – 4.32 (m, 1H), 5.12 (br s, 1H), 5.89 (br s, 1H), 6.91 (br s, 1H), 7.80 (d, $J = 8.46$ Hz, 1H), 7.94 (t, $J = 5.51$ Hz, 1H).
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.6, 21.8, 22.3, 22.4, 23.0, 23.1, 24.3, 25.0, 25.1, 36.7, 38.0, 41.3, 42.7, 51.2, 75.1, 79.0, 167.8, 172.2, 173.2.
MS (CI)	m/z 389 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 371, 343, 314, 257, 201, 161, 115, 85.
HRMS (CI)	m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ 389.2652; gef. 389.2653.
HPLC-ESI-MS	m/z 389 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 411 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 427 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (568). (S,S)-Diol-Tripeptid **560** (93 mg, 0.20 mmol), Triisopropylsilan (103 μl , 0.5 mmol), Trifluoressigsäure (205 μl , 2.6 mmol), DCM (0.4 ml, 6.4 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 64 mg (79%) **568** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +32.6$ ($c = 0.51$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3318, 3095, 3066, 3031, 2957, 2932, 2871, 1722, 1646, 1529, 1469, 1449, 1386, 1368, 1259, 1229, 1171, 1159, 1096, 1072, 698.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.79 (d, $J = 6.18$ Hz, 6H), 0.84 (d, $J = 6.98$ Hz, 6H), 1.12 – 1.24 (m, 2H), 1.27 – 1.36 (m, 1H), 1.41 – 1.62 (m, 3H), 2.92 – 3.03 (m, 2H), 4.09 – 4.24 (m, 1H), 4.66 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 7.20 – 7.26 (m, 2H), 7.55 – 7.74 (m, 3H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.6, 22.3, 22.4, 23.1, 24.0, 24.9, 36.6, 37.9, 41.3, 51.2, 74.9, 79.6, 125.3, 127.2, 125.9, 139.5, 161.3, 171.1, 172.0.
MS (EI)	m/z 408 (M^+), 372, 363, 334, 322, 294, 258, 248, 227, 201, 185, 164, 142, 135, 105, 86, 71, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+) ⁺ 408.2260; gef. 408.2255.
HPLC-ESI-MS	m/z 409 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 431 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 447 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

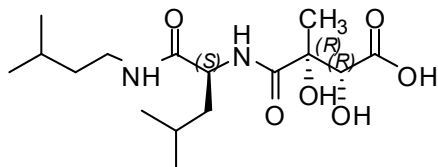
Tripeptid (569). (*S,S*)-Diol-Tripeptid **561** (96 mg, 0.20 mmol), Triisopropylsilan (103 μl , 0.5 mmol), Trifluoressigsäure (205 μl , 2.6 mmol), DCM (0.4 ml, 6.4 mmol)). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 60 mg (71%) **569** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20.3$ ($c = 0.05$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3303, 3088, 3065, 3033, 2957, 2929, 2870, 1714, 1644, 1552, 1496, 1469, 1455, 1437, 1386, 1368, 1257, 1228, 1204, 1170, 1103, 700.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.84 (dd, $J = 6.72, 2.42$ Hz, 12H), 1.39 (q, $J = 7.25$ Hz, 2H), 1.46 – 1.57 (m, 3H), 1.67 – 1.73 (m, 1H), 2.85 (d, $J = 13.43$ Hz, 1H), 2.92 (d, $J = 13.43$ Hz, 1H), 3.03 – 3.08 (m, 2H), 4.19 (s, 1H), 4.31 – 4.37 (m, 1H), 5.30 (br s, 1H), 6.07 (br s, 1H), 7.09 – 7.19 (m, 5H), 7.47 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 5.37$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.8, 22.3, 22.4, 23.0, 23.9, 25.1, 36.8, 38.0, 40.7, 41.4, 51.2, 79.1, 126.0, 127.4, 130.3, 136.3, 170.9, 171.3, 172.5.
MS (EI)	m/z 422 (M^+), 404, 386, 377, 348, 308, 273, 262, 258, 227, 201, 182, 161, 142, 114, 91, 86, 71, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+) ⁺ 422.2417; gef. 422.2417.

HPLC-ESI-MS m/z 423 (M+H)⁺, 445 (M+Na)⁺, 461 (M+K)⁺.

Tripeptid (570). (*R,R*)-Diol-Tripeptid **562** (80 mg, 0.20 mmol), Triisopropylsilan (103 μ l, 0.5 mmol), Trifluoressigsäure (205 μ l, 2.6 mmol), DCM (0.4 ml, 6.4 mmol)). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 37 mg (53%) **570** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -31.9$ (c = 0.15, MeOH).

IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3346, 3103, 2957, 2931, 2871, 1731, 1647, 1527, 1458, 1393, 1369, 1257, 1238, 1226, 1158, 1106.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 0.85 (t, *J* = 5.78 Hz, 12H), 0.97 – 1.10 (m, 1H), 1.27 (s, 3H), 1.36 (q, *J* = 7.30 Hz, 2H), 1.44 – 1.62 (m, 3H), 2.99 – 3.09 (m, 2H), 4.05 (s, 1H), 4.20 – 4.33 (m, 1H), 5.00 (br s, 1H), 5.42 (br s, 1H), 5.93 (br s, 1H), 7.44 – 7.53 (m, 1H), 7.83 – 7.97 (m, 1H).

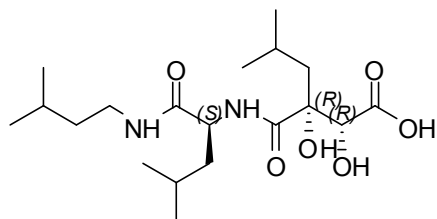
¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-d₆) 21.9, 22.3, 22.4, 22.7, 23.0, 24.0, 25.1, 36.7, 37.9, 41.5, 51.0, 74.9, 76.1, 171.3, 173.0, 173.5.

MS (EI) m/z 346 (M)⁺, 331, 301, 271, 232, 201, 186, 158, 142, 119, 107, 90, 86, 59, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für C₁₆H₃₀N₂O₆ (M)⁺ 346.2104; gef. 346.2100.

HPLC-ESI-MS m/z 347 (M+H)⁺, 391 (M+Na)⁺, 407 (M+K)⁺.

Tripeptid (571). (*R,R*)-Diol-Tripeptid **563** (89 mg, 0.20 mmol), Triisopropylsilan (103 μ l, 0.5 mmol), Trifluoressigsäure (205 μ l, 2.6 mmol), DCM (0.4 ml, 6.4 mmol)). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 43 mg (55%) **571** als weißen Feststoff.



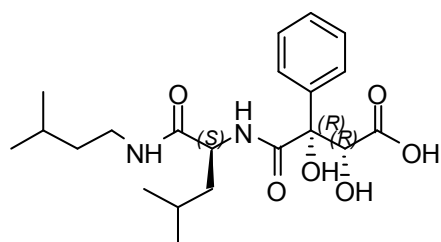
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -27.2$ (c = 0.15, MeOH).

IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3304, 3100, 2957, 2930, 2871, 1736, 1644, 1536, 1469, 1437, 1386, 1368, 1221, 1205, 1169, 1157, 1100.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-d₆) 0.84 (dd, *J* = 6.65, 3.29 Hz, 12H), 0.93 (d, *J* = 6.85 Hz, 6H), 1.26 (q, *J* = 7.30 Hz, 2H), 1.35 – 1.44 (m, 3H), 1.53 –

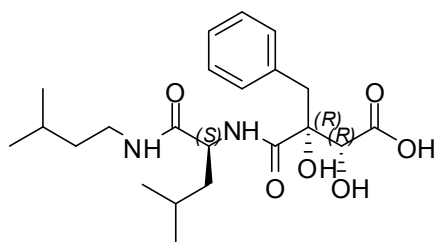
	1.60 (m, 2H), 1.74 – 1.78 (m, 1H), 1.88 – 1.95 (m, 1H), 3.01 – 3.09 (m, 2H), 4.07 (s, 1H), 4.27 – 4.32 (m, 1H), 5.12 (br s, 1H), 5.89 (br s, 1H), 6.92 (br s, 1H), 7.80 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 7.93 (t, $J = 5.53$ Hz, 1H).
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.6, 21.8, 22.3, 22.4, 23.0, 23.1, 24.0, 25.0, 25.1, 36.7, 38.0, 41.3, 43.1, 51.2, 75.1, 79.0, 171.2, 171.3, 173.2.
MS (EI)	m/z 388 (M^+), 344, 314, 301, 274, 255, 240, 214, 183, 171, 140, 115, 86, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$ (M^+) ⁺ 388.2573; gef. 388.2563.
HPLC-ESI-MS	m/z 389 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 411 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 427 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (572). (*R,R*)-Diol-Tripeptid **564** (93 mg, 0.20 mmol), Triisopropylsilan (103 μl , 0.5 mmol), Trifluoressigsäure (205 μl , 2.6 mmol), DCM (0.4 ml, 6.4 mmol)). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 57 mg (70%) **572** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -32.7$ ($c = 0.50$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3309, 3093, 3069, 3038, 2957, 2932, 2871, 1647, 1529, 1469, 1449, 1386, 1368, 1260, 1204, 1172, 1159, 1141, 698.
^1H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.80 (d, $J = 6.18$ Hz, 6H), 0.84 (d, $J = 6.98$ Hz, 6H), 1.12 – 1.24 (m, 2H), 1.27 – 1.35 (m, 1H), 1.40 – 1.62 (m, 3H), 2.92 – 3.03 (m, 2H), 4.09 – 4.24 (m, 1H), 4.66 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 7.19 – 7.28 (m, 2H), 7.54 – 7.70 (m, 3H).
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.6, 22.3, 22.4, 22.9, 24.0, 24.9, 36.6, 37.9, 41.7, 51.2, 74.9, 79.6, 125.9, 127.2, 127.3, 139.5, 170.7, 171.1, 172.0.
MS (ESI)	m/z 409 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 343, 294, 271, 236, 214, 198, 173, 158, 141, 116.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ 409.2336; gef. 409.2333.
HPLC-ESI-MS	m/z 409 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 431 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 447 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (573). (*R,R*)-Diol-Tripeptid **565** (96 mg, 0.20 mmol), Triisopropylsilan (103 μ l, 0.5 mmol), Trifluoressigsäure (205 μ l, 2.6 mmol), DCM (0.4 ml, 6.4 mmol)). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 63 mg (75%) **573** als weißen Feststoff.



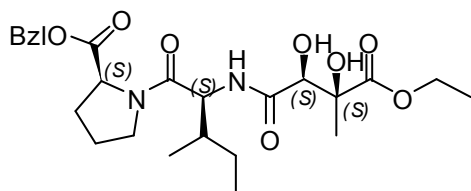
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -22.4$ (c = 0.07, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3302, 3088, 3065, 3033, 2957, 2929, 2870, 1714, 1644, 1532, 1496, 1469, 1455, 1437, 1386, 1368, 1285, 1257, 1228, 1204, 1170, 1157, 1103, 700.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.84 (dd, <i>J</i> = 6.72, 2.42 Hz, 12H), 1.38 (q, <i>J</i> = 7.32 Hz, 2H), 1.46 – 1.58 (m, 3H), 1.67 – 1.73 (m, 1H), 2.85 (d, <i>J</i> = 13.25 Hz, 1H), 2.92 (d, <i>J</i> = 13.25 Hz, 1H), 3.03 – 3.08 (m, 2H), 4.19 (s, 1H), 4.31 – 4.37 (m, 1H), 5.30 (br s, 1H), 6.07 (br s, 1H), 7.09 – 7.19 (m, 5H), 7.47 (d, <i>J</i> = 8.60 Hz, 1H), 7.59 (t, <i>J</i> = 5.40 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 21.8, 22.3, 22.4, 23.0, 23.9, 25.1, 36.7, 38.0, 40.7, 41.4, 51.2, 74.4, 79.1, 126.0, 127.4, 130.2, 136.2, 170.9, 171.2, 172.5.
MS (CI)	<i>m/z</i> 423 (M+H) ⁺ , 405, 377, 361, 308, 258, 227, 201, 161, 136, 120, 86.
HRMS (CI)	<i>m/z</i> ber. für C ₂₂ H ₃₅ N ₂ O ₆ (M+H) ⁺ 423.2495; gef. 423.2485.
HPLC-ESI-MS	<i>m/z</i> 423 (M+H) ⁺ , 445 (M+Na) ⁺ , 461 (M+K) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der Tripeptide (574 – 581)

Zu einer Lösung von (*S,S*)-Diol oder (*R,R*)-Diol (0.5 mmol) in DMF (1.4 ml) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung für 15 min gerührt. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hat tropft man das Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml) zu. Anschließend gibt man in zwei Portionen über einen Zeitraum von 15 min PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) zur Reaktionslösung und rührt für weitere 12 h bei Raumtemperatur. Danach verdünnt man die Reaktionslösung mit Diethylether (9.5 ml) und rührt für 10 min. Daraufhin wird die organische Phase zuerst dreimal mit ges. NH₄Cl-Lsg. (6.0 ml) und dann mit Wasser (6.0 ml) gewaschen. Folgend werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wird zweimal mit Diethylether (10.0 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter

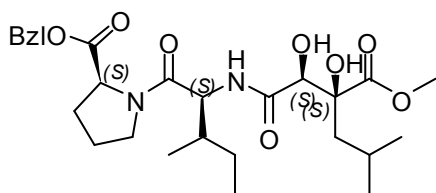
reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat).

Tripeptid (574). (*S,S*)-Diol **477** (96.1 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.4 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) Diethylether (12.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 145.1 mg (59%) **574** als weißen Feststoff.



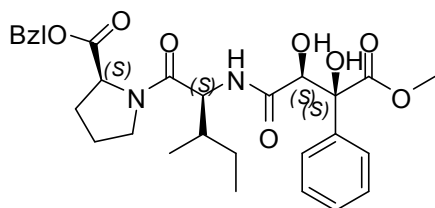
DC	$R_f = 0.28$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +64.9$ ($c = 0.13$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3393, 3296, 3091, 3067, 3035, 2967, 2936, 2878, 1737, 1626, 1530, 1500, 1455, 1383, 1355, 1277, 1247, 1216, 1172, 1119, 1097, 1018, 843.
$^1\text{H-NMR}$	δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.75 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.99 – 1.09 (m, 2H), 1.17 (t, $J = 7.05$ Hz, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.46 – 1.52 (m, 1H), 1.67 – 1.93 (m, 4H), 2.16 – 2.21 (m, 1H), 3.56 – 3.62 (m, 1H), 3.69 – 3.76 (m, 1H), 4.06 (q, $J = 7.30$ Hz, 2H), 4.36 (dd, $J = 8.60$, 5.10 Hz, 1H), 4.47 (t, $J = 8.52$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 2.15$ Hz, 2H), 5.30 (s, 1H, [S]), 6.08 (d, $J = 6.45$ Hz, 1H), 7.30 – 7.42 (m, 5H), 7.71 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H), 7.94 (br s, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 10.8, 14.5, 14.8, 21.2, 23.5, 24.6, 28.7, 36.9, 47.0, 53.4, 58.6, 60.4, 65.9, 75.5, 76.4, 127.8, 128.0, 128.4, 135.9, 169.9, 170.0, 171.5, 173.8.
MS (EI)	m/z 492 (M^+), 436, 419, 376, 345, 321, 288, 260, 243, 203, 187, 149, 135, 107, 73, 44.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$ (M^+) $^+$ 492.2471; gef. 492.2466.
HPLC-ESI-MS	m/z 493 ($M+H$) $^+$, 515 ($M+Na$) $^+$, 531 ($M+K$) $^+$.

Tripeptid (575). (*S,S*)-Diol **478** (110 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.4 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) Diethylether (10.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 176.8 mg (68%) **575** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.31$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +42.2$ ($c = 0.55$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3369, 3094, 3066, 3037, 2960, 2876, 1740, 1627, 1534, 1500, 1455, 1385, 1357, 1318, 1277, 1237, 1170, 1103, 844. 747.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.73 (t, $J = 7.45$ Hz, 3H), 0.76 (d, $J = 6.31$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.45$ Hz, 6H), 1.04 – 1.18 (m, 1H), 1.47 – 1.55 (m, 1H), 1.58 – 1.72 (m, 4H), 1.81 – 1.93 (m, 3H), 2.14 – 2.20 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.71 – 3.77 (m, 1H), 3.96 – 4.02 (m, 1H), 4.35 (dd, $J = 8.53, 5.17$ Hz, 1H), 4.47 (t, $J = 6.45$ Hz, 1H), 5.05 (s, 1H, [S]), 5.11 (d, $J = 2.42$ Hz, 2H), 6.09 (d, $J = 6.18$ Hz, 1H), 7.30 – 7.42 (m, 5H), 7.70 (d, $J = 8.19$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 8.46$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.6, 14.7, 23.1, 23.5, 23.7, 24.3, 24.6, 28.7, 36.7, 42.5, 47.0, 51.8, 53.4, 58.5, 65.9, 76.5, 79.7, 127.8, 128.0, 128.4, 135.9, 170.0, 171.1, 171.5, 174.4.
MS (EI)	m/z 520 (M^+), 488, 464, 432, 407, 393, 376, 345, 316, 288, 256, 206, 187, 145, 135, 107, 90, 77, 52.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8$ (M^+) ⁺ 520.2784; gef. 520.2795.
HPLC-ESI-MS	m/z 521 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 543 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 559 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

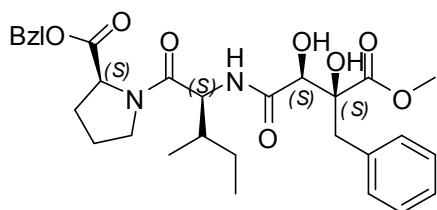
Tripeptid (576). (*S,S*)-Diol **479** (120.1 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.4 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) Diethylether (9.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 199.8 mg (74%) **576** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.28$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +40.6$ ($c = 0.15$, MeOH).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3372, 3153, 3092, 3065, 3037, 2963, 2933, 2877, 2729, 1740, 1626, 1525, 1498, 1448, 1381, 1356, 1259, 1238, 1172, 1100, 1023, 744, 700.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.68 (t, J = 7.46 Hz, 3H), 0.72 (d, J = 6.85 Hz, 3H), 0.91 – 1.02 (m, 1H), 1.32 – 1.41 (m, 1H), 1.57 – 1.64 (m, 2H), 1.77 – 1.90 (m, 2H), 2.09 – 2.18 (m, 1H), 3.45 – 3.57 (m, 2H), 3.62 (s, 3H), 4.29 (t, J = 8.33 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 6.72 Hz, 1H), 5.09 (d, J = 1.21 Hz, 2H), 6.13 (s, 1H, [S]), 6.32 (d, J = 6.85 Hz, 1H), 7.21 – 7.28 (m, 2H), 7.30 – 7.36 (m, 5H), 7.44 (d, J = 9.40 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 7.39 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 8.33 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 8.33 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 10.7, 14.6, 23.5, 24.4, 28.7, 36.8, 46.8, 52.4, 58.5, 59.8, 65.9, 75.9, 80.7, 126.1, 127.3, 127.4, 127.8, 128.0, 128.4, 135.9, 138.3, 169.3, 169.7, 171.5, 172.9.
MS (EI)	m/z 540 (M) ⁺ , 484, 448, 376, 336, 308, 247, 206, 180, 149, 135, 107, 91, 71, 55.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₉ H ₃₆ N ₂ O ₈ (M) ⁺ 540.2471; gef. 540.2472.
HPLC-ESI-MS	m/z 542 (M+H) ⁺ , 563 (M+Na) ⁺ , 579 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (577). (S,S)-Diol **480** (127.2 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.4 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) Diethylether (10.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 188.4 mg (68%) **577** als weißen Feststoff.



DC	R_f = 0.29 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +18.1 (c = 0.15, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3388, 3091, 3065, 3033, 2960, 2926, 2877, 2854, 1736, 1669, 1626, 1533, 1496, 1455, 1381, 1360, 1318, 1280, 121, 1185, 1104, 848, 745, 701.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.79 (t, J = 7.12 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 0.99 – 1.09 (m, 1H), 1.54 – 1.59 (m, 1H), 1.73 – 1.98 (m, 4H), 2.14 – 2.24 (m, 1H), 2.95 (s, 2H), 3.52 (s, 3H), 3.58 – 3.65 (m, 1H), 3.74 – 3.79 (m, 1H), 4.38 (dd, J = 8.60, 5.10 Hz, 1H), 4.54 (t, J = 6.45 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 5.20 (s, 1H, [S]), 6.21 (d, J = 6.72 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 6.72 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 7.52 Hz, 2H), 7.30 – 7.43 (m, 5H),

7.54 (t, $J = 7.66$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H).

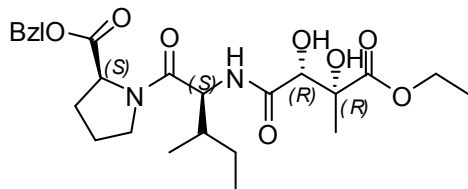
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.7, 14.1, 23.5, 24.6, 28.7, 36.9, 40.5, 47.0, 51.7, 58.6, 59.8, 65.9, 75.5, 80.6, 126.3, 127.7, 127.8, 128.1, 128.4, 130.1, 135.9, 136.5, 169.9, 170.2, 171.5, 173.0.

MS (EI) m/z 554 (M^+), 522, 498, 463, 414, 374, 350, 322, 262, 232, 206, 149, 135, 107, 90, 77.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8$ (M^+)⁺ 554.2628; gef. 554.2643.

HPLC-ESI-MS m/z 555 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 577 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 593 ($\text{M}+\text{K}$)⁺.

Tripeptid (578). (*R,R*)-Diol **481** (96.1 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.4 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μl , 0.5 mmol), Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) Diethylether (12.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 132.8 mg (54%) **578** als weißen Feststoff.



DC $R_f = 0.38$ (*n*-Hexan/EtOAc = 1:2).

Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -64.6$ ($c = 0.13$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3398, 3242, 3067, 2968, 2936, 2879, 1736, 1672, 1623, 1534, 1500, 1456, 1382, 1357, 1323, 1277, 1260, 1172, 1122, 1096, 1014, 844, 745.

^1H -NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.77 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.96 – 1.05 (m, 1H), 1.15 (t, $J = 6.98$ Hz, 3H), 1.41 – 1.48 (m, 1H), 1.71 – 1.99 (m, 4H), 2.15 – 2.22 (m, 1H), 3.54 – 3.60 (m, 1H), 3.73 – 3.79 (m, 1H), 4.03 (q, $J = 7.16$ Hz, 2H), 4.35 (dd, $J = 8.33, 5.37$ Hz, 1H), 4.42 (t, $J = 6.73$ Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 5.34 (s, 1H, [*R*]), 5.91 (d, $J = 6.98$ Hz, 1H), 7.30 – 7.42 (m, 5H), 7.71 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H).

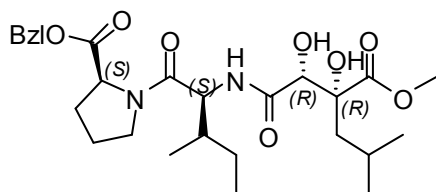
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.8, 13.9, 14.9, 21.5, 23.8, 24.6, 28.7, 36.7, 46.9, 53.8, 58.6, 60.3, 65.8, 74.9, 76.4, 127.8, 128.0, 128.4, 135.9, 169.6, 170.7, 171.5, 173.4.

MS (EI) m/z 492 (M^+), 436, 375, 345, 301, 288, 260, 206, 186, 149, 135, 107, 90, 77, 52.

HRMS (EI) m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$ (M^+)⁺ 492.2471; gef. 492.2463.

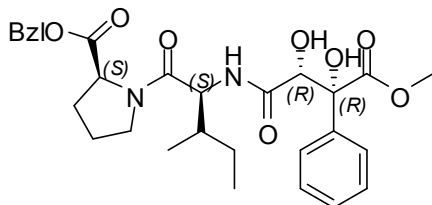
HPLC-ESI-MS m/z 493 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 515 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 531 ($\text{M}+\text{K}$)⁺.

Tripeptid (579). (*R,R*)-Diol **482** (110.1 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.4 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) Diethylether (10.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 145.6 mg (56%) **579** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.45$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -44.1$ ($c = 0.15$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3388, 3233, 3090, 3065, 3037, 2960, 2929, 2876, 1738, 1623, 1536, 1499, 1455, 1383, 1358, 1324, 1277, 1237, 1168, 1098, 1048, 849, 745, 700.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.73 (t, $J = 7.45$ Hz, 3H), 0.76 (d, $J = 6.31$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.45$ Hz, 6H), 1.04 – 1.18 (m, 1H), 1.47 – 1.55 (m, 1H), 1.58 – 1.72 (m, 4H), 1.81 – 1.93 (m, 3H), 2.14 – 2.20 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.70 – 3.77 (m, 1H), 3.99 – 4.02 (m, 1H), 4.35 (dd, $J = 8.53, 5.17$ Hz, 1H), 4.45 (t, $J = 6.45$ Hz, 1H), 5.10 (s, 1H, [R]), 5.11 (d, $J = 2.42$ Hz, 2H), 6.10 (d, $J = 6.18$ Hz, 1H), 7.30 – 7.42 (m, 5H), 7.70 (d, $J = 8.19$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 8.46$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.7, 14.8, 23.0, 23.6, 24.2, 24.6, 26.5, 28.7, 36.4, 42.8, 46.9, 51.7, 58.6, 59.7, 65.8, 75.5, 79.8, 127.8, 128.0, 128.4, 135.9, 169.7, 170.5, 171.6, 174.1.
MS (EI)	m/z 520 (M^+), 464, 432, 376, 316, 288, 256, 228, 206, 149, 135, 107, 90, 63.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8$ (M^+) ⁺ 520.2784; gef. 520.2784.
HPLC-ESI-MS	m/z 521 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 543 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 559 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

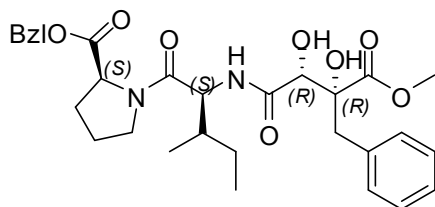
Tripeptid (580). (*R,R*)-Diol **483** (120.1 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.4 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μ l, 0.5 mmol), Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) Diethylether (9.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 143.1 mg (53%) **580** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.38$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
-----------	--

Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -41.2$ ($c = 0.17$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3388, 3291, 3065, 3033, 2963, 2928, 2877, 2855, 1740, 1626, 1531, 1498, 1449, 1382, 1353, 1322, 1250, 1216, 1173, 1133, 1096, 1075, 843, 699.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.68 (t, $J = 7.46$ Hz, 3H), 0.72 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 0.91 – 1.02 (m, 1H), 1.32 – 1.41 (m, 1H), 1.57 – 1.64 (m, 2H), 1.79 – 1.90 (m, 2H), 2.09 – 2.18 (m, 1H), 3.45 – 3.56 (m, 2H), 3.62 (s, 3H), 4.29 (t, $J = 8.33$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 6.72$ Hz, 1H), 5.09 (d, $J = 1.21$ Hz, 2H), 6.03 (s, 1H, [R]), 6.33 (d, $J = 6.85$ Hz, 1H), 7.21 – 7.28 (m, 2H), 7.29 – 7.36 (m, 5H), 7.44 (d, $J = 9.40$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 7.39$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.6, 14.5, 23.5, 24.5, 28.7, 36.4, 46.8, 52.3, 53.6, 58.5, 65.8, 74.6, 80.8, 126.1, 127.5, 127.6, 127.8, 128.0, 128.4, 135.9, 138.5, 169.5, 170.1, 171.5, 172.5.
MS (EI)	m/z 541 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 507, 446, 419, 376, 342, 294, 271, 242, 226, 174, 136, 89.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 541.2549; gef. 541.2543.
HPLC-ESI-MS	m/z 541 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 563 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 579 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (581). (*R,R*)-Diol **484** (127.1 mg, 0.5 mmol) in DMF (1.4 ml), Diisopropylethylamin (85.5 μl , 0.5 mmol), Dipeptid **326** (191 mg, 0.6 mmol) als Lösung in DMF (1.7 ml), PyBOP (416 mg, 0.8 mmol) Diethylether (10.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 158.1 mg (57%) **581** als weißen Feststoff.



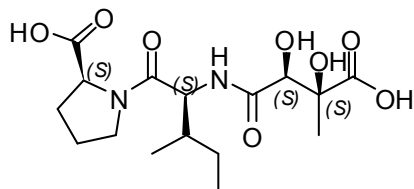
DC	$R_f = 0.37$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.2$ ($c = 0.14$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3394, 3091, 3064, 3034, 2965, 2930, 2879, 2855, 1736, 1670, 1627, 1533, 1497, 1455, 1381, 1361, 1319, 1281, 1214, 1183, 1126, 1105, 1046, 843, 746, 702.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.79 (t, $J = 7.12$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.00 – 1.09 (m, 1H), 1.54 – 1.59 (m, 1H), 1.75 – 1.98 (m, 4H), 2.16 – 2.23 (m, 1H), 2.95 (s, 2H), 3.52 (s, 3H), 3.60 – 3.65 (m, 1H), 3.72 – 3.78 (m, 1H), 4.38 (dd, $J = 8.60, 5.10$ Hz, 1H), 4.54 (t, $J = 6.45$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.18 (s, 1H, [R]), 6.22 (d, $J = 6.72$ Hz, 1H), 7.05 (d, J

	= 6.72 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 7.52 Hz, 2H), 7.28 – 7.41 (m, 5H), 7.53 (t, J = 7.66 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 8.33 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.33 Hz, 1H).
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.7, 14.1, 23.5, 24.6, 28.7, 36.9, 40.5, 47.0, 51.7, 53.5, 59.8, 65.9, 75.5, 80.1, 126.2, 127.7, 127.8, 128.0, 124.4, 130.1, 135.9, 136.5, 169.9, 170.1, 171.5, 173.0.
MS (EI)	m/z 554 (M^+), 498, 463, 405, 376, 350, 322, 293, 262, 224, 187, 149, 135, 107, 90, 77, 52.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8$ (M^+) ⁺ 554.2628; gef. 554.2619.
HPLC-ESI-MS	m/z 555 ($M+\text{H}$) ⁺ , 577 ($M+\text{Na}$) ⁺ , 593 ($M+\text{K}$) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Entschützung der Tripeptide (582 – 589)

Zu einer Lösung von (*S,S*)-Diol- oder (*R,R*)-Diol-Tripeptid (0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (0.6 ml/0.1 mmol) wird bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre (Argon) über eine Spritzenpumpe (0.5 ml/0.5 h) eine 0.5 M Lithiumhydroxid-Lsg. (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq) zugetropft. Nach 3 - 4 h Reaktionszeit (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung mit 1 M HCl-Lsg. auf pH 2 – 3 titriert und für weitere 10 min gerührt. Die trübe Lösung wird dreimal mit Ethylacetat (10.0 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und abfiltriert. Das Rohprodukt wird mittels Diethylether oder *n*-Hexan ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert und mit Diethylether (10.0 ml) oder *n*-Hexan (10.0 ml) gewaschen. Das Produkt wird zuerst am Hochvakuum für 24 h getrocknet, dann in Acetonitril aufgenommen, mit Wasser ausgefällt und lyophilisiert. Nach zweimaliger Lyophilisation erhält man einen sauberen weißen Feststoff. Einzelne Tripeptide wurden für die biologische Testierung noch zusätzlich mittels präparativer HPLC (t_R = 8.0 min [15% bis 50% CH_3CN in 30 min]) gereinigt.

Tripeptid (582). (*S,S*)-Diol-Tripeptid **574** (98 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (1.2 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H_2O (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq). Die



Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (0.5/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 50.9 mg (68%) **582** als weißen Feststoff.

Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +69.1 (c = 0.12, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3396, 2958, 2925, 2873, 2854, 1709, 1621, 1530, 1458, 1379, 1362, 1226, 1182, 1152, 1106.
^1H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.79 (t, J = 7.39 Hz, 3H), 0.91 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.02 – 1.16 (m, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.51 – 1.55 (m, 1H), 1.72 – 1.94

(m, 4H), 2.10 – 2.18 (m, 1H), 3.55 – 3.60 (m, 1H), 3.69 – 3.75 (m, 1H), 4.23 (dd, $J = 8.60, 4.84$ Hz, 1H), 4.41 – 4.45 (m, 1H), 4.48 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 12.59 (br s, 2H).

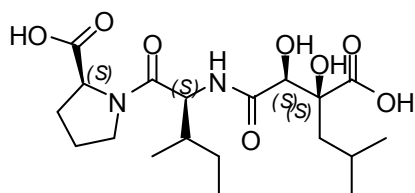
$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.8, 14.9, 21.8, 23.5, 24.5, 28.7, 36.9, 46.9, 53.4, 58.5, 75.4, 76.0, 169.7, 170.3, 173.2, 175.7.

MS (ESI) m/z 375 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 343, 271, 232, 214, 198, 181, 173, 133, 158, 141, 116.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_8$ (M^+) $^+$ 375.1762; gef. 375.1765.

HPLC-ESI-MS m/z 375 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 397 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 413 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (583). (*S,S*)-Diol-Tripeptid **575** (104 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (1.2 ml), 0.5 M



Lithiumhydroxid in H_2O (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (0.5/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 49.1 mg (59%) **583** als weißen Feststoff.

Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +53.7$ ($c = 0.17$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3384, 3301, 2961, 2930, 2876, 1720, 1620, 1529, 1454, 1391, 1360, 1278, 1229, 1181, 1157, 1106.

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.79 (d, $J = 6.72, 4.97$ Hz, 6H), 0.84 (t, $J = 7.40$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 6.18$ Hz, 3H), 1.01 – 1.16 (m, 1H), 1.43 – 1.56 (m, 1H), 1.60 – 1.92 (m, 7H), 2.09 – 2.17 (m, 1H), 3.53 – 3.60 (m, 1H), 3.70 – 3.78 (m, 1H), 4.21 (dd, $J = 8.19, 4.70$ Hz, 1H), 4.40 – 4.45 (m, 1H), 4.48 (s, 1H), 5.16 (br s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 13.21 (br s, 2H).

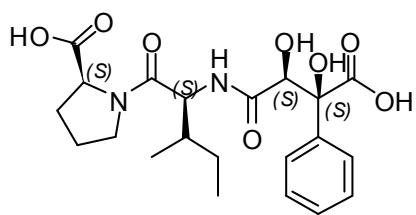
$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.9, 14.9, 23.3, 23.6, 24.3, 24.5, 24.6, 28.7, 36.7, 42.2, 46.9, 54.0, 58.5, 75.3, 79.0, 169.8, 170.3, 172.7, 175.6.

MS (ESI) m/z 417 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 358, 302, 274, 257, 236, 214, 198, 173, 158, 141, 116.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 417.2231; gef. 417.2232.

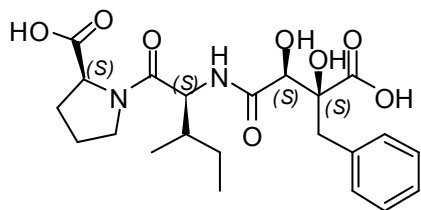
HPLC-ESI-MS m/z 417 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 439 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 455 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (584). (S,S)-Diol-Tripeptid **576** (108 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (1.2 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 61.9 mg (71%) **584** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +88.1$ (c = 0.53, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3386, 3301, 3088, 3063, 2964, 2926, 2877, 1718, 1621, 1535, 1451, 1382, 1360, 1272, 1266, 1189, 1131, 1104, 700.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.71 (t, <i>J</i> = 7.39 Hz, 3H), 0.77 (d, <i>J</i> = 6.72 Hz, 3H), 0.88 – 1.04 (m, 1H), 1.36 – 1.41 (m, 1H), 1.57 – 1.67 (m, 1H), 1.75 – 1.90 (m, 3H), 2.05 – 2.11 (m, 1H), 3.41 – 3.52 (m, 2H), 4.13 (dd, <i>J</i> = 8.87, 4.57 Hz, 1H), 4.26 (t, <i>J</i> = 8.87 Hz, 1H), 4.48 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 5.73 (br s, 1H), 6.23 (br s, 1H), 7.19 – 7.27 (m, 3H), 7.57 (d, <i>J</i> = 8.06 Hz, 2H), 12.62 (br s, 2H).
¹³C-NMR	δ_C (100 MHz; DMSO-d ₆) 10.8, 14.8, 23.5, 24.4, 28.7, 36.9, 46.7, 53.2, 58.4, 75.9, 80.2, 126.2, 126.6, 128.0, 138.8, 168.6, 169.5, 173.1, 174.0.
MS (ESI)	<i>m/z</i> 437 (M') ⁺ , 413, 343, 322, 294, 233, 214, 173, 116.
HRMS (ESI)	<i>m/z</i> ber. für C ₂₁ H ₂₉ N ₂ O ₈ (M') ⁺ 437.1918; gef. 437.1913.
HPLC-ESI-MS	<i>m/z</i> 437 (M+H) ⁺ , 459 (M+Na) ⁺ , 475 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (585). (S,S)-Diol-Tripeptid **577** (111 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (1.2 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1.5/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1.5/10). Man erhält 63.0 mg (70%) **585** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +74.9$ (c = 0.82, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3386, 3090, 3064, 2966, 2929, 1712, 1626, 1532, 1455, 1393, 1362, 1229, 1185, 1154, 1106, 747.
¹H-NMR	δ_H (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.84 (t, <i>J</i> = 7.39 Hz, 3H), 0.95 (d, <i>J</i> = 6.72 Hz, 3H), 1.14 – 1.23 (m, 1H), 1.44 – 1.59 (m, 1H), 1.75 – 1.94 (m, 4H), 2.11 – 2.17 (m, 1H), 3.41 – 3.50 (m, 2H), 3.59 – 3.64 (m, 1H), 3.72 – 3.78 (m, 1H), 4.19 – 4.42 (m, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.54 (t, <i>J</i> = 8.60 Hz,

1H), 5.16 (s, 1H), 6.10 (br s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.14 – 7.23 (m, 3H), 7.51 (d, $J = 7.52$ Hz, 2H), 12.97 (br s, 2H).

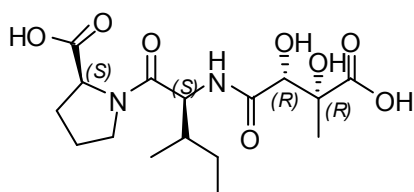
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.7, 14.9, 23.5, 24.5, 28.7, 36.9, 40.0, 46.9, 53.5, 58.5, 75.5, 79.8, 126.4, 127.6, 130.2, 136.7, 169.8, 170.4, 173.2, 174.2.

MS (ESI) m/z 451 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 413, 336, 308, 262, 214, 173, 158, 141.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 451.2074; gef. 451.2073.

HPLC-ESI-MS m/z 451 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 473 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 489 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (586). (*R,R*)-Diol-Tripeptid **578** (98 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (1.2 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H_2O (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (0.5/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 43.4 mg (58%) **586** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -68.9$ ($c = 0.12$, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3390, 2957, 2930, 2854, 1709, 1621, 1530, 1458, 1379, 1362, 1227, 1180, 1150, 1106.

^1H -NMR δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.79 (t, $J = 7.40$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.02 – 1.15 (m, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.51 – 1.55 (m, 1H), 1.70 – 1.92 (m, 4H), 2.10 – 2.18 (m, 1H), 3.55 – 3.59 (m, 1H), 3.69 – 3.74 (m, 1H), 4.23 (dd, $J = 8.60, 4.84$ Hz, 1H), 4.41 – 4.45 (m, 1H), 4.48 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 12.60 (br s, 2H).

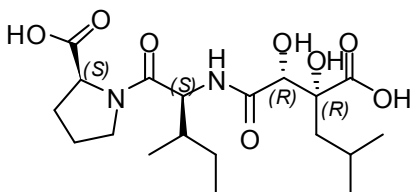
^{13}C -NMR δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.9, 15.1, 22.1, 23.9, 24.6, 28.8, 36.7, 46.9, 54.1, 58.6, 75.0, 76.1, 169.6, 170.9, 173.3, 175.6.

MS (ESI) m/z 397 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 375, 230, 136.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_1$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 397.1581; gef. 397.1571.

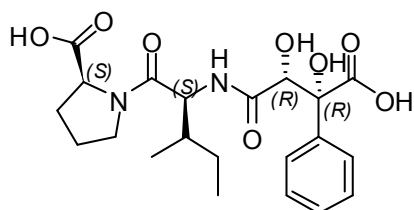
HPLC-ESI-MS m/z 375 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 397 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 413 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (587). (*R,R*)-Diol-Tripeptid **579** (104 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (1.2 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H_2O (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (0.5/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 50.7 mg (61%) **587** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -52.2$ ($c = 0.18$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3380, 3300, 2960, 2930, 2878, 1722, 1620, 1529, 1454, 1392, 1360, 1278, 1227, 1182, 1159, 1106.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.79 (d, $J = 6.73$, 4.97 Hz, 6H), 0.84 (t, $J = 7.40$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.18$ Hz, 3H), 1.00 – 1.15 (m, 1H), 1.42 – 1.56 (m, 1H), 1.59 – 1.92 (m, 7H), 2.10 – 2.15 (m, 1H), 3.52 – 3.61 (m, 1H), 3.70 – 3.77 (m, 1H), 4.20 (dd, $J = 8.19$, 4.70 Hz, 1H), 4.41 – 4.45 (m, 1H), 4.46 (s, 1H), 5.18 (br s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 13.19 (br s, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.9, 15.2, 20.8, 23.3, 23.5, 23.8, 24.6, 28.8, 36.7, 43.2, 47.0, 54.3, 58.6, 75.7, 78.8, 169.6, 171.0, 173.3, 175.5.
MS (ESI)	m/z 417 ($\text{M}+\text{H}^+$), 373, 309, 270, 251, 229, 206, 158, 136.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 417.2231; gef. 417.2227.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_1$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 439.2050; gef. 439.2039.
HPLC-ESI-MS	m/z 417 ($\text{M}+\text{H}^+$), 439 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 455 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Tripeptid (588). (*R,R*)-Diol-Tripeptid **580** (108 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (1.2 ml), 0.5 M



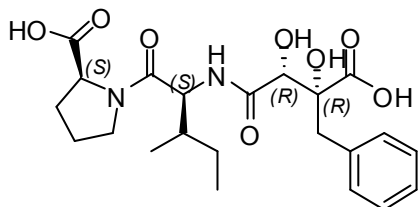
Lithiumhydroxid in H_2O (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (1.5/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 58.4 mg (67%) **588** als weißen Feststoff.

Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -87.7$ ($c = 0.52$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3380, 3300, 3087, 3062, 2960, 2925, 2876, 1720, 1621, 1451, 1382, 1361, 1226, 1189, 1131, 1104, 1074, 700.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.71 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H), 0.77 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.89 – 1.04 (m, 1H), 1.36 – 1.40 (m, 1H), 1.56 – 1.67 (m, 1H), 1.76 – 1.89 (m, 3H), 2.07 – 2.11 (m, 1H), 3.41 – 3.51 (m, 2H), 4.12 (dd, $J = 8.87$, 4.57 Hz, 1H), 4.27 (t, $J = 8.87$ Hz, 1H), 4.48 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 5.71 (br s, 1H), 6.22 (br s, 1H), 7.20 – 7.26 (m, 3H), 7.57 (d, $J = 8.05$ Hz, 2H), 12.60 (br s, 2H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.7, 14.7, 23.5, 24.4, 28.7, 36.5, 46.8, 53.7, 58.5, 74.9, 80.3, 126.5, 126.7, 128.1, 139.0, 169.4, 170.3, 173.2, 173.7.
MS (ESI)	m/z 437 ($\text{M}+\text{H}^+$), 309, 251, 229, 116.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 437.1918; gef. 437.1912.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{21}H_{28}N_2O_8Na_1$ ($M+Na$)⁺ 459.1737; gef. 459.1727.

HPLC-ESI-MS m/z 437 ($M+H$)⁺, 459 ($M+Na$)⁺, 475 ($M+K$)⁺.

Tripeptid (589). (*R,R*)-Diol-Tripeptid **581** (111 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) in THF (1.2 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (1.2 ml, 0.6 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 56.7 mg (63%) **589** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -73.1$ ($c = 0.78$, MeOH).

IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3380, 3091, 3065, 3033, 2966, 2929, 2880, 1712, 1626, 1533, 1455, 1391, 1362, 1229, 1185, 1106, 747.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO-*d*₆) 0.84 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.14 – 1.22 (m, 1H), 1.44 – 1.57 (m, 1H), 1.76 – 1.94 (m, 4H), 2.11 – 2.16 (m, 1H), 3.41 – 3.48 (m, 2H), 3.59 – 3.63 (m, 1H), 3.72 – 3.77 (m, 1H), 4.20 – 4.41 (m, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.54 (t, $J = 8.60$ Hz, 1H), 5.17 (s, 1H), 6.11 (br s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.14 – 7.22 (m, 3H), 7.51 (d, $J = 7.52$ Hz, 2H), 12.99 (br s, 2H).

¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO-*d*₆) 10.8, 14.9, 23.6, 24.6, 28.8, 36.9, 40.2, 47.0, 53.6, 58.6, 75.5, 79.8, 126.7, 127.3, 128.1, 136.8, 169.8, 170.5, 173.2, 174.3.

MS (ESI) m/z 473 ($M+Na$)⁺, 441, 353, 236, 228.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{22}H_{30}N_2O_8Na_1$ ($M+Na$)⁺ 473.1894; gef. 473.1911.

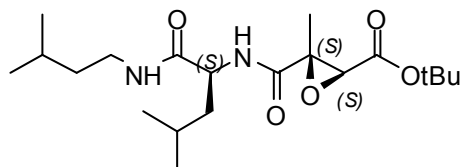
HPLC-ESI-MS m/z 451 ($M+H$)⁺, 473 ($M+Na$)⁺, 489 ($M+K$)⁺.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der Tripeptide (590 – 598)

Zu einer Lösung von (*S,S*)-, oder (*rac*)-Epoxid (0.2 mmol) in DMF (1.7 ml) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Diisopropylethylamin (31 μ l, 0.18 mmol) zugetropft und die Reaktionslösung für 5 min gerührt. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hat tropft man das Dipeptid **321** (48 mg, 0.24 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (1084 μ l) zu. Anschließend gibt man in zwei Portionen über einen Zeitraum von 5 min PyBOP (109 mg, 0.21 mmol) zur Reaktionslösung und rührt für weitere 16 h bei Raumtemperatur. Folgend verdünnt man die Reaktionslösung mit Diethylether (9.0 ml) und rührt für weitere 15 Minuten. Daraufhin wird die organische Phase dreimal mit ges. NH₄Cl-Lsg. (8.0 ml) gewaschen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit Diethylether (6.0 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄

getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat oder *n*-Hexan/Diethylether).

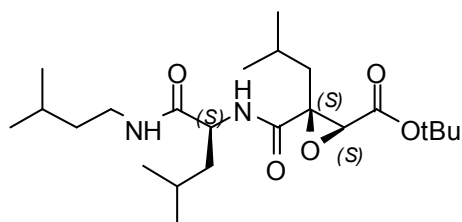
Tripeptid (590). (*S,S*)-Epoxid **511** (40.4 mg, 0.2 mmol) in DMF (1.7 ml), DIPEA (31 μ l, 0.18



mmol), Dipeptid **321** (48 mg, 0.24 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (1084 μ l), PyBOP (109 mg, 0.21 mmol) Diethylether (9.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 40 mg (52%) **590** als weißen Feststoff.

DC	$R_f = 0.28$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +55.9$ ($c = 0.15$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 2956, 2929, 2870, 1738, 1654, 1528, 1469, 1418, 1394, 1369, 1386, 1311, 1229, 1157, 1086.
$^1\text{H-NMR}$	δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.81 (d, $J = 6.45$ Hz, 6H), 0.84 (d, $J = 6.72$ Hz, 6H), 1.22 – 1.29 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.52 – 1.60 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 3.00 – 3.07 (m, 2H), 3.61 (s, 1H), 4.23 – 4.29 (m, 1H), 6.21 (s, 1H), 7.83 (t, $J = 5.78$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 14.6, 21.4, 22.3, 22.4, 23.0, 24.4, 25.1, 27.8, 36.7, 38.0, 40.4, 51.6, 65.2, 66.1, 80.4, 165.1, 167.9, 171.5.
MS (EI)	m/z 384 (M^+), 328, 311, 298, 270, 214, 186, 170, 143, 111, 97, 86, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$ (M^+) 384.2624; gef. 384.2613.
HPLC-ESI-MS	m/z 385 ($M+H$), 407 ($M+Na$), 423 ($M+K$).

Tripeptid (591). (*S,S*)-Epoxid **512** (36.6 mg, 0.125 mmol) in DMF (956 μ l), DIPEA (31 μ l,

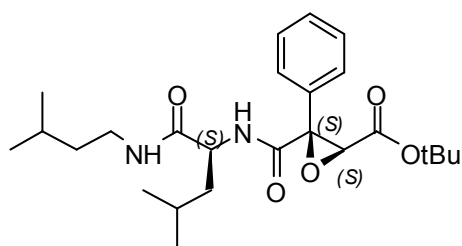


0.113 mmol), Dipeptid **321** (30 mg, 0.15 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (678 μ l), PyBOP (68 mg, 0.131 mmol) Diethylether (5.6 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 32.5 mg (61%) **591** als weißen Feststoff.

DC	$R_f = 0.24$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 2:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +17.4$ ($c = 0.12$, MeOH).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 2957, 2928, 2870, 1750, 1650, 1525, 1468, 1393, 1387, 1369, 1312, 1281, 1224, 1156.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.82 (d, J = 6.75 Hz, 12H), 0.85 (d, J = 6.45 Hz, 6H), 1.15 – 1.21 (m, 2H), 1.34 – 1.44 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.47 – 1.60 (m, 3H), 1.72 – 1.79 (m, 1H), 2.11 – 2.18 (m, 1H), 2.99 – 3.07 (m, 2H), 3.51 (s, 1H), 4.19 – 4.25 (m, 1H), 5.97 (s, 1H), 7.61 (d, J = 8.60 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 21.2, 21.6, 21.8, 22.3, 22.4, 22.9, 23.0, 24.3, 25.0, 27.6, 36.7, 37.9, 40.8, 42.7, 51.1, 56.5, 62.1, 82.7, 165.0, 167.3, 171.2.
MS (EI)	m/z 426 (M) ⁺ , 411, 370, 355, 325, 312, 284, 256, 227, 214, 196, 168, 143, 98, 86, 70, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₃ H ₄₂ N ₂ O ₅ (M) ⁺ 426.3093; gef. 426.3093.
HPLC-ESI-MS	m/z 427 (M+H) ⁺ , 449 (M+Na) ⁺ , 465 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (592). (S,S)-Epoxid **509** (52.8 mg, 0.2 mmol) in DMF (1.7 ml), DIPEA (31 μ l, 0.18



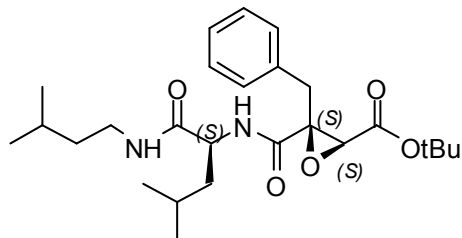
mmol), Dipeptid **321** (48 mg, 0.24 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (1084 μ l), PyBOP (109 mg, 0.21 mmol) Diethylether (9.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 52.6 mg (59%) **592** als weißen Feststoff.

DC	R_f = 0.24 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +36.4 (c = 0.11, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3087, 3066, 3032, 2957, 2932, 2871, 1755, 1726, 1650, 1530, 1469, 1449, 1393, 1369, 1313, 1248, 1232, 1159, 697.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.82 (d, J = 6.72 Hz, 6H), 0.86 (d, J = 6.45 Hz, 6H), 1.03 – 1.06 (m, 1H), 1.20 – 1.25 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.48 – 1.54 (m, 2H), 1.68 – 1.75 (m, 1H), 2.96 – 3.03 (m, 2H), 4.04 (s, 1H), 4.13 – 4.19 (m, 1H), 7.32 – 7.40 (m, 5H), 7.66 (d, J = 1.62 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 1.62 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 21.3, 22.3, 22.4, 23.0, 23.3, 25.0, 27.1, 36.7, 37.9, 40.7, 50.4, 59.6, 62.6, 81.9, 126.5, 127.7, 128.1, 131.2, 163.5, 164.3, 170.9.
MS (EI)	m/z 446 (M) ⁺ , 390, 360, 345, 332, 276, 248, 232, 192, 165, 147, 111, 105, 86, 69, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{25}H_{38}N_2O_5$ (M^+)⁺ 446.2780; gef. 446.2773.

HPLC-ESI-MS m/z 447 ($M+H$)⁺, 469 ($M+Na$)⁺, 485 ($M+K$)⁺.

Tripeptid (593). (S,S)-Epoxid **510** (34.8 mg, 0.125 mmol) in DMF (956 μ l), DIPEA (31 μ l, 0.113 mmol), Dipeptid **321** (30 mg, 0.15 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (678 μ l), PyBOP (68 mg, 0.131 mmol) Diethylether (5.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 29.9 mg (52%) **593** als weißen Feststoff.



DC R_f = 0.26 (*n*-Hexan/EtOAc = 3:1).

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ = +41.1 (c = 0.19, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3086, 3066, 3032, 2957, 2930, 2871, 1716, 1650, 1625, 1594, 1538, 1514, 1468, 1456, 1386, 1368, 1233, 1149, 849.

1H -NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.82 (d, J = 6.58 Hz, 6H), 0.86 (d, J = 6.85 Hz, 6H), 1.01 – 1.04 (m, 1H), 1.20 – 1.25 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.46 – 1.54 (m, 3H), 2.98 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.16 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.22 – 3.26 (m, 2H), 3.93 – 3.96 (m, 1H), 4.04 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 7.31 (d, J = 8.46 Hz, 1H), 7.38 – 7.49 (m, 4H), 7.79 (d, J = 8.46 Hz, 1H).

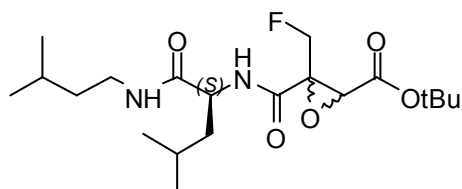
^{13}C -NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 21.3, 22.3, 22.4, 23.0, 24.4, 25.0, 27.2, 36.7, 37.9, 40.8, 44.4, 50.4, 59.6, 65.0, 81.9, 125.5, 128.1, 129.8, 130.0, 164.3, 167.7, 170.9.

MS (EI) m/z 460 (M^+)⁺, 404, 386, 346, 317, 271, 215, 201, 176, 159, 131, 107, 86, 57.

HRMS (EI) m/z ber. für $C_{26}H_{40}N_2O_5$ (M^+)⁺ 460.2937; gef. 460.2930.

HPLC-ESI-MS m/z 461 ($M+H$)⁺, 483 ($M+Na$)⁺, 499 ($M+K$)⁺.

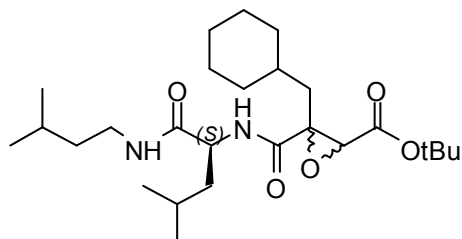
Tripeptid (594). (rac)-Epoxid **513** (44 mg, 0.2 mmol) in DMF (1.7 ml), DIPEA (31 μ l, 0.18 mmol), Dipeptid **321** (48 mg, 0.24 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (1084 μ l), PyBOP (109 mg, 0.21 mmol) Diethylether (10.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 2:1). Man erhält 32.9 mg (41%) **594** als gelblichen Feststoff.



DC R_f = 0.26 (*n*-Hexan/DEE = 2:1).

Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -64.3$ ($c = 0.08$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 2957, 2932, 2871, 1739, 1650, 1542, 1469, 1457, 1387, 1369, 1283, 1251, 1152, 1018, 843.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.81 (dd, $J = 9.25, 6.50$ Hz, 6H), 0.85 (dd, $J = 9.25, 6.51$ Hz, 6H), 1.22 – 1.29 (m, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.47 – 1.51 (m, 2H), 1.57 – 1.60 (m, 1H), 3.00 – 3.08 (m, 2H), 3.81 (s, 1H), 4.26 – 4.34 (m, 1H), 5.00 (d, $J = 1.61$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 1.63$ Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 8.41 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.8, 22.3, 22.4, 22.9, 24.1, 25.1, 27.4, 36.8, 37.9, 41.4, 50.9, 55.5, 55.6, 61.2, 61.4, 82.6, 82.9, 84.3, 163.3, 163.6, 170.6, 170.7, 170.8.
MS (EI)	m/z 402 (M^+), 346, 329, 316, 288, 268, 232, 200, 188, 159, 116, 105, 86, 70, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{F}_1\text{N}_2\text{O}_5$ (M^+) ⁺ 402.2530; gef. 402.2532.
HPLC-ESI-MS	m/z 403 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 425 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 441 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (595). (*rac*)-Epoxid **514** (35.5 mg, 0.125 mmol) in DMF (956 μl), DIPEA (31 μl , 0.113 mmol), Dipeptid **321** (30 mg, 0.15 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (678 μl), PyBOP (68 mg, 0.131 mmol) Diethylether (6.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 3:1). Man erhält 23.9 mg (41%) **595** als weißen Feststoff.

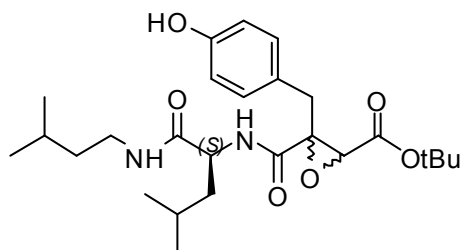


DC	$R_f = 0.33$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 3:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -55.2$ ($c = 0.12$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3295, 3086, 2957, 2932, 2871, 2723, 2617, 2539, 1700, 1623, 1538, 1469, 1437, 1386, 1368, 1279, 1247, 1227, 1161, 1138.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.81 (dd, $J = 6.12, 3.16$ Hz, 6H), 0.85 (dd, $J = 6.11, 3.16$ Hz, 6H), 1.15 – 1.20 (m, 2H), 1.24 – 1.28 (m, 3H), 1.35 – 1.40 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.50 – 1.60 (m, 6H), 1.71 – 1.82 (m, 2H), 2.11 – 2.19 (m, 1H), 2.98 – 3.07 (m, 2H), 3.51 (s, 1H), 4.19 – 4.25 (m, 1H), 7.58 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.45$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 21.8, 22.3, 22.4, 22.9, 24.3, 25.0, 26.0, 26.6, 27.6, 28.1, 31.9, 34.4, 36.7, 38.0, 40.8, 51.1, 58.6, 62.1, 82.7, 167.3, 167.6, 171.2.
MS (ESI)	m/z 467 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 411, 377, 343, 321, 297, 249, 195, 173, 163, 141.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{26}H_{47}N_2O_5$ ($M+H$)⁺ 467.3479; gef. 467.3473.

HPLC-ESI-MS m/z 467 ($M+H$)⁺, 489 ($M+Na$)⁺, 505 ($M+K$)⁺.

Tripeptid (596). (*rac*)-Epoxid **518** (36.8 mg, 0.125 mmol) in DMF (956 μ l), DIPEA (31 μ l, 0.113 mmol), Dipeptid **321** (30 mg, 0.15 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (678 μ l), PyBOP (68 mg, 0.131 mmol) Diethylether (4.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 25.6 mg (43%) **596** als weißen Feststoff.



DC R_f = 0.20 (*n*-Hexan/EtOAc = 2:1).

Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ = +16.1 (c = 0.14, MeOH).

IR ν_{max} (cm^{-1}) 3343, 3004, 2976, 2957, 2929, 2872, 2854, 1712, 1678, 1633, 1606, 1514, 1444, 1393, 1368, 1336, 1276, 1259, 1225, 1150, 1104, 834, 746.

¹H-NMR δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0.82 (d, J = 6.25 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.31 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.58 Hz, 6H), 1.22 (q, J = 6.45 Hz, 2H), 1.28 – 1.44 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.50 – 1.57 (m, 1H), 3.01 – 3.06 (m, 2H), 2.99 (d, J = 13.70 Hz, 1H), 3.04 (d, J = 13.57 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H), 4.10 – 4.13 (m, 1H), 5.65 (br s, 1H), 6.65 (d, J = 8.46 Hz, 2H), 6.79 (d, J = 8.46 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 8.60 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.33 Hz, 1H).

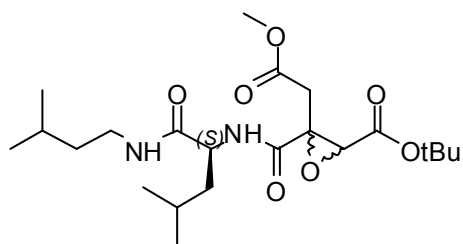
¹³C-NMR δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 21.3, 22.3, 22.4, 23.0, 24.4, 25.0, 27.2, 36.6, 37.9, 40.7, 44.3, 50.4, 65.0, 70.6, 81.8, 117.5, 120.2, 130.0, 156.2, 166.7, 167.7, 170.9.

MS (ESI) m/z 499 ($M+Na$)⁺, 483, 476, 416, 374, 276, 136.

HRMS (ESI) m/z ber. für $C_{26}H_{40}N_2O_6Na_1$ ($M+Na$)⁺ 499.2778; gef. 499.2771.

HPLC-ESI-MS m/z 477 ($M+H$)⁺, 499 ($M+Na$)⁺, 515 ($M+K$)⁺.

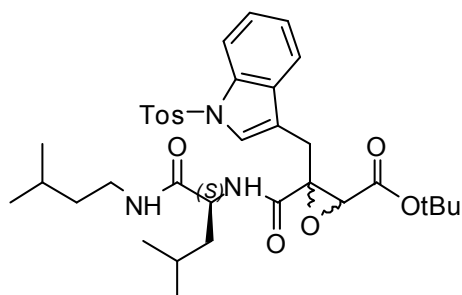
Tripeptid (597). (*rac*)-Epoxid **516** (42 mg, 0.125 mmol) in DMF (956 μ l), DIPEA (31 μ l, 0.113 mmol), Dipeptid **321** (30 mg, 0.15 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (678 μ l), PyBOP (68 mg, 0.131 mmol) Diethylether (5.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 2:1). Man erhält 22.7 mg (35%) **597** als weißen Feststoff.



DC R_f = 0.27 (*n*-Hexan/EtOAc = 2:1).

Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -22.8$ ($c = 0.07$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 2956, 2925, 2871, 2854, 1718, 1672, 1616, 1539, 1460, 1444, 1395, 1371, 1317, 1280, 1259, 1232, 1154, 843.
MS (ESI)	m/z 443 ($M+H$) ⁺ , 425, 371, 356, 328, 301, 257, 214, 181, 173, 158, 141, 116.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $C_{22}H_{39}N_2O_7$ ($M+H$) ⁺ 443.2751; gef. 443.2758.
HPLC-ESI-MS	m/z 443 ($M+H$) ⁺ , 465 ($M+Na$) ⁺ , 481 ($M+K$) ⁺ .

Tripeptid (598). (*rac*)-Epoxid **517** (58.9 mg, 0.125 mmol) in DMF (956 μl), DIPEA (31 μl , 0.113 mmol), Dipeptid **321** (30 mg, 0.15 mmol) als 0.185 M Lösung in DMF (678 μl), PyBOP (68 mg, 0.131 mmol) Diethylether (7.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Diethylether = 1:1). Man erhält 22.9 mg (28%) **598** als bräunlichen Feststoff.



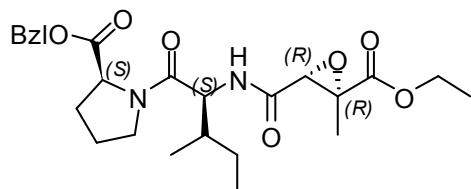
DC	$R_f = 0.24$ (<i>n</i> -Hexan/DEE = 1:1).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -18.7$ ($c = 0.19$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3331, 3061, 3003, 2977, 2950, 2930, 2874, 1705, 1623, 1581, 1525, 1493, 1460, 1431, 1368, 1333, 1267, 1196, 1152, 1097, 1070, 786, 757, 744.
MS (ESI)	m/z 653 (M) ⁺ , 647, 624, 573, 536, 485, 467, 345, 338, 316, 282, 260, 228, 200, 150, 136.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $C_{35}H_{47}N_3O_7S_1$ (M) ⁺ 653.3129; gef. 653.3119.
HPLC-ESI-MS	m/z 654 ($M+H$) ⁺ , 676 ($M+Na$) ⁺ , 692 ($M+K$) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Darstellung der Tripeptide (599 – 607)

Zu einer Lösung von (*R,R*)-, oder (*rac*)-Epoxid (0.2 mmol) in DMF (560 μl) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Diisopropylethylamin (30.8 μl , 0.18 mmol) zugetropft und die Reaktionslösung für 5 min gerührt. Nachdem sich eine homogene Lösung gebildet hat tropft man das Dipeptid **326** (70.1 mg, 0.22 mmol) als Lösung in DMF (623 μl) zu. Anschließend gibt man in zwei Portionen über einen Zeitraum von 5 min PyBOP (124.8 mg, 0.24 mmol) zur Reaktionslösung und rührt für weitere 10 h bei Raumtemperatur. Daraufhin verdünnt man die Reaktionslösung mit Diethylether (3.8 ml) und rührt für 15 min. Folgend wird die organische Phase zuerst dreimal mit ges. NH_4Cl -Lsg. (2.4 ml) und dann mit Wasser (2.4 ml) gewaschen. Die Phasen werden getrennt, und die wässrige Phase wird zweimal mit Diethylether (4.0 ml) extrahiert. Die vereinigten

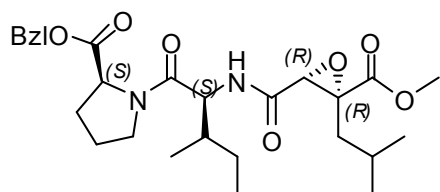
organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat oder *n*-Hexan/Diethylether).

Tripeptid (599). (*R,R*)-Epoxid **487** (34.8 mg, 0.2 mmol) in DMF (560 μl), DIPEA (30.8 μl , 0.18 mmol), Dipeptid **326** (70.1 mg, 0.22 mmol) als Lösung in DMF (623 μl), PyBOP (124.8 mg, 0.24 mmol), Diethylether (4.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 54.0 mg (57%) **599** als weißen Feststoff.



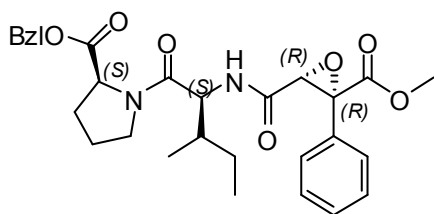
DC	$R_f = 0.27$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -39.2$ ($c = 0.13$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 2960, 2933, 2876, 2853, 2797, 1743, 1680, 1641, 1617, 1526, 1449, 1390, 1377, 1357, 1319, 1277, 1236, 1181, 1154, 1128, 1105, 744.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d_6) 0.78 (t, $J = 7.40$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 1.08 – 1.18 (m, 1H), 1.30 (t, $J = 6.98$ Hz, 3H), 1.37 – 1.43 (m, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.91 – 1.94 (m, 2H), 2.14 – 2.22 (m, 1H), 3.46 – 3.54 (m, 2H), 4.12 (q, $J = 7.16$ Hz, 2H), 4.16 – 4.22 (m, 1H), 4.25 (s, 1H), 4.36 – 4.46 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 7.31 – 7.41 (m, 5H), 7.50 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d_6) 12.4, 14.1, 14.7, 24.6, 25.9, 26.0, 28.8, 36.3, 46.6, 54.4, 58.7, 61.4, 65.9, 66.6, 67.0, 127.8, 128.1, 128.5, 135.9, 168.4, 169.7, 169.9, 171.6.
MS (ESI)	m/z 497 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 474, 453, 441, 425, 411, 344, 225, 188.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}_1$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 497.2258; gef. 497.2242.
HPLC-ESI-MS	m/z 475 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 497 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 513 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (600). (*R,R*)-Epoxid **488** (40.4 mg, 0.2 mmol) in DMF (560 μl), DIPEA (30.8 μl , 0.18 mmol), Dipeptid **326** (70.1 mg, 0.22 mmol) als Lösung in DMF (623 μl), PyBOP (124.8 mg, 0.24 mmol), Diethylether (4.0 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 61.2 mg (61%) **600** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.31$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -28.8$ ($c = 0.18$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3090, 3066, 3037, 2959, 2930, 2875, 1743, 1644, 1627, 1528, 1448, 1386, 1356, 1318, 1278, 1259, 1236, 1167, 1127, 1099, 745.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.77 (t, $J = 7.25$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 6.30$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 6.44$ Hz, 6H), 1.00 – 1.13 (m, 2H), 1.36 – 1.48 (m, 2H), 1.73 – 1.96 (m, 5H), 2.15 – 2.22 (m, 1H), 3.57 – 3.65 (m, 2H), 3.69 (s, 1H), 3.78 – 3.84 (m, 1H), 4.33 – 4.37 (m, 1H), 4.41 (s, 1H), 5.11 (d, $J = 2.42$ Hz, 2H), 6.69 (d, $J = 6.18$ Hz, 1H), 7.28 – 7.41 (m, 5H)
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.5, 14.5, 22.3, 24.0, 24.6, 25.1, 25.2, 28.7, 35.9, 40.9, 47.0, 52.6, 57.1, 58.6, 62.5, 65.9, 71.0, 127.4, 128.0, 128.4, 135.9, 164.6, 169.2, 169.7, 171.5.
MS (EI)	m/z 502 (M^+) ⁺ , 446, 400, 372, 314, 270, 545, 204, 155, 107, 90, 77, 70.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7$ (M^+) ⁺ 502.2679; gef. 502.2683.
HPLC-ESI-MS	m/z 503 ($M+H$) ⁺ , 525 ($M+Na$) ⁺ , 541 ($M+K$) ⁺ .

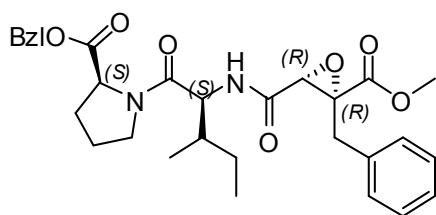
Tripeptid (601). (*R,R*)-Epoxid **485** (44.4 mg, 0.2 mmol) in DMF (560 μl), DIPEA (30.8 μl , 0.18 mmol), Dipeptid **326** (70.1 mg, 0.22 mmol) als Lösung in DMF (623 μl), PyBOP (124.8 mg, 0.24 mmol), Diethylether (4.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 68.9 mg (66%) **601** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.33$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -81.6$ ($c = 0.25$, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm^{-1}) 3090, 3066, 3035, 3003, 2962, 2928, 2882, 2852, 1735, 1640, 1617, 1528, 1456, 1394, 1379, 1361, 1321, 1280, 1229, 1184, 1156, 1106, 847, 746.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.78 (t, $J = 7.46$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H), 0.97 – 1.05 (m, 1H), 1.34 – 1.41 (m, 1H), 1.45 – 1.49 (m, 2H), 1.76 – 1.93 (m, 2H), 2.11 – 2.17 (m, 1H), 3.46 – 3.57 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 4.03 – 4.17 (m, 1H), 4.25 – 4.31 (m, 1H), 5.09 (s, 1H), 5.12 (d, $J = 6.85$ Hz, 1H), 5.24 (d, $J = 6.85$ Hz, 1H), 7.25 – 7.35 (m, 5H), 7.39 (t, $J = 7.39$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.33$ Hz, 2H), 7.70 (t, $J = 7.25$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H).

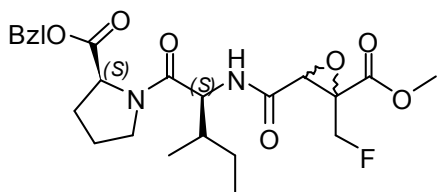
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.9, 14.6, 24.5, 26.0, 29.1, 36.8, 46.9, 52.9, 54.0, 58.5, 66.0, 68.9, 73.9, 124.7, 127.5, 127.7, 127.9, 128.1, 128.5, 136.0, 142.9, 169.3, 169.4, 171.4, 171.6.
MS (ESI)	m/z 545 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 522, 503, 494, 485, 441, 405, 397, 367, 341, 296, 228, 180, 119.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}_1$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 545.2258; gef. 545.2259.
HPLC-ESI-MS	m/z 523 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 545 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 561 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (602). (*R,R*)-Epoxid **486** (47.2 mg, 0.2 mmol) in DMF (560 μl), DIPEA (30.8 μl , 0.18 mmol), Dipeptid **326** (70.1 mg, 0.22 mmol) als Lösung in DMF (623 μl), PyBOP (124.8 mg, 0.24 mmol), Diethylether (4.2 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 64.3 mg (60%) **602** als weißen Feststoff.



DC	R_f = 0.20 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -20.1 (c = 0.25, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3090, 3063, 3040, 2964, 2932, 2877, 2853, 2800, 1742, 1640, 1617, 1529, 1497, 1454, 1391, 1378, 1358, 1320, 1279, 1226, 1182, 1154, 1128, 1105, 845, 745.
$^1\text{H-NMR}$	δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.78 (t, J = 7.12 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.06 – 1.15 (m, 1H), 1.30 – 1.39 (m, 1H), 1.44 – 1.49 (m, 2H), 1.78 – 1.93 (m, 2H), 2.13 – 2.20 (m, 1H), 2.99 (dd, J = 8.60, 1H), 3.11 (dd, J = 8.60 Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.63 – 3.84 (m, 2H), 3.74 – 3.79 (m, 1H), 4.40 (dd, J = 8.60, 5.10 Hz, 1H), 4.46 – 4.56 (m, 1H), 4.63 (s, 1H), 5.11 (d, J = 6.72 Hz, 1H), 5.17 (d, J = 6.72 Hz, 1H), 7.07 (t, J = 7.52 Hz, 2H), 7.17 (t, J = 7.66 Hz, 1H), 7.26 – 7.34 (m, 5H), 7.39 (d, J = 8.33 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.33 Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.7, 15.0, 24.0, 24.7, 28.7, 36.3, 37.7, 47.1, 52.3, 54.2, 58.7, 65.8, 66.0, 71.2, 124.6, 127.4, 128.0, 128.5, 129.8, 130.2, 135.2, 136.0, 166.9, 169.7, 171.1, 171.5.
MS (ESI)	m/z 559 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 506, 441, 341, 296, 206, 131.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}_1$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 559.2414; gef. 559.2412.
HPLC-ESI-MS	m/z 537 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 559 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 575 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (603). (*rac*)-Epoxid **489** (35.6 mg, 0.2 mmol) in DMF (560 μ l), DIPEA (30.8 μ l, 0.18 mmol), Dipeptid **326** (70.1 mg, 0.22 mmol) als



Lösung in DMF (623 μ l), PyBOP (124.8 mg, 0.24 mmol), Diethylether (5.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 42.1 mg (44%) **603** als weißen Feststoff.

DC $R_f = 0.30$ (*n*-Hexan/EtOAc = 1:2).

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -27.5$ ($c = 0.08$, MeOH).

IR ν_{\max} (cm^{-1}) 3095, 3052, 2959, 2931, 2873, 2855, 1743, 1706, 1648, 1616, 1540, 1455, 1393, 1379, 1361, 1320, 1280, 1229, 1183, 1155, 1105, 1026, 845, 781, 745.

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (400 MHz; DMSO- d_6) 0.73 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.72$ Hz, 3H), 0.97 – 1.05 – (m, 2H), 1.40 – 1.47 (m, 2H), 1.71 – 1.91 (m, 2H), 2.15 – 2.19 (m, 1H), 3.60 – 3.79 (m, 2H), 3.64 (s, 3H), 4.47 (s, 1H), 4.62 – 4.70 (m, 1H), 4.74 – 4.81 (m, 1H), 4.87 (d, $J = 7.25$ Hz, 1H), 5.06 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 5.11 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H), 7.27 – 7.35 (m, 5H), 7.66 (d, $J = 8.63$ Hz, 1H).

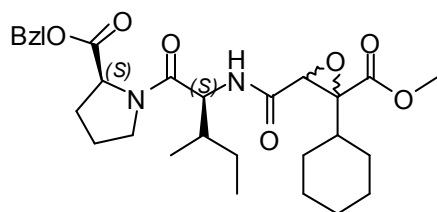
$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.7, 14.2, 24.0, 26.6, 28.7, 38.0, 46.1, 52.1, 55.2, 59.3, 66.5, 68.8, 69.0, 70.6, 70.7, 79.5, 81.1, 127.4, 127.9, 128.4, 136.0, 161.9, 162.0, 168.0, 171.7, 171.8.

MS (ESI) m/z 501 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 483, 341, 293, 180, 158.

HRMS (ESI) m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{F}_1\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}_1$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 501.2007; gef. 501.2003.

HPLC-ESI-MS m/z 479 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 501 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 517 ($\text{M}+\text{K}$) $^+$.

Tripeptid (604). (*rac*)-Epoxid **490** (35.6 mg, 0.1 mmol) in DMF (280 μ l), DIPEA (15.4 μ l, 0.09 mmol), Dipeptid **326** (35.1 mg, 0.11 mmol) als



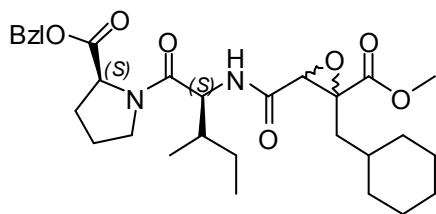
Lösung in DMF (312 μ l), PyBOP (62.4 mg, 0.12 mmol), Diethylether (2.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 24.8 mg (47%) **604** als weißen Feststoff.

DC $R_f = 0.30$ (*n*-Hexan/EtOAc = 1:1).

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -33.8$ ($c = 0.11$, MeOH).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3089, 3064, 3033, 2955, 2925, 2876, 2852, 1745, 1678, 1647, 1523, 1499, 1448, 1383, 1352, 1323, 1313, 1275, 1257, 1241, 1207, 1170, 1109, 1098, 699.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.76 (t, J = 7.40 Hz, 3H), 0.81 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 1.07 – 1.18 (m, 2H), 1.35 – 1.40 (m, 3H), 1.61 – 1.74 (m, 8H), 1.78 – 2.03 (m, 4H), 2.13 – 2.21 (m, 1H), 3.50 – 3.58 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 4.30 – 4.36 (m, 1H), 4.38 (d, J = 7.25 Hz, 1H), 4.89 – 4.91 (m, 1H), 5.11(d, J = 2.15 Hz, 2H), 7.30 – 7.36 (m, 5H), 7.98(d, J = 8.85 Hz, 1H).
¹³C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO-d ₆) 10.7, 14.6, 23.7, 24.6, 25.5, 25.7, 26.3, 28.7, 29.2, 36.4, 41.3, 47.0, 52.1, 54.2, 58.6, 62.7, 65.8, 72.0, 127.8, 127.9, 128.4, 135.9, 167.6, 169.4, 171.1, 171.5.
MS (EI)	m/z 528 (M ⁺) ⁺ , 512, 456, 424, 368, 345, 308, 296, 280, 248, 204, 195, 180, 135, 91, 70.
HRMS (EI)	m/z ber. für C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₇ (M ⁺) ⁺ 528.2835; gef. 528.2848.
HPLC-ESI-MS	m/z 529 (M+H) ⁺ , 551 (M+Na) ⁺ , 567 (M+K) ⁺ .

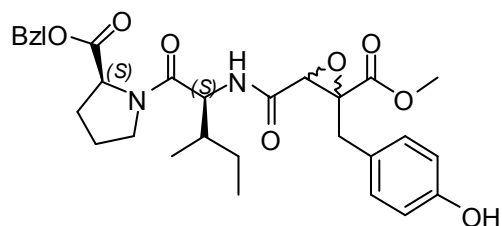
Tripeptid (605). (*rac*)-Epoxid **491** (24.2 mg, 0.1 mmol) in DMF (280 μ l), DIPEA (15.4 μ l, 0.09 mmol), Dipeptid **326** (35.1 mg, 0.11 mmol) als Lösung in DMF (312 μ l), PyBOP (62.4 mg, 0.12 mmol), Diethylether (3.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhält 26.6 mg (49%) **605** als weißen Feststoff.



DC	R_f = 0.32 (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:1).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -71.9 (c = 0.15, MeOH).
IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3090, 3064, 3032, 2954, 2925, 2876, 2854, 1745, 1678, 1648, 1520, 1499, 1448, 1382, 1350, 1323, 1313, 1272, 1254, 1207, 1170, 1109, 699.
¹H-NMR	δ_{H} (400 MHz; DMSO-d ₆) 0.76 (t, J = 7.40 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.72 Hz, 3H), 0.94 – 1.08 (m, 5H), 1.35 – 1.40 (m, 3H), 1.60 – 1.65 (m, 5H), 1.70 – 1.78 (m, 3H), 1.80 – 2.03 (m, 4H), 2.13 – 2.21 m, 1H), 3.52 – 3.57 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.67 – 3.71 (m, 1H), 4.30 – 4.36 (m, 1H), 4.38 (t, J = 8.50 Hz, 1H), 5.11(d, J = 2.15 Hz, 2H), 7.33 – 7.38 (m, 5H), 8.00 (d, J = 8.87 Hz, 1H).

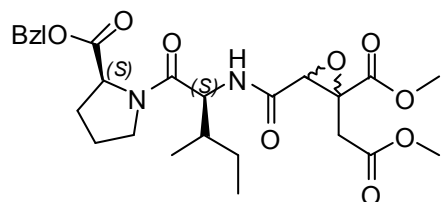
^{13}C-NMR	δ_{C} (100 MHz; DMSO- d_6) 10.7, 14.6, 23.7, 24.6, 25.5, 25.7, 26.3, 28.7, 32.5, 32.7, 34.3, 36.4, 46.9, 52.1, 54.2, 57.7, 58.6, 62.7, 65.8, 127.8, 128.0, 128.4, 135.9, 164.6, 167.6, 169.4, 171.5.
MS (EI)	m/z 542 (M^+), 486, 434, 398, 354, 338, 310, 294, 278, 224, 209, 194, 149, 123, 111, 91, 83, 71, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7$ (M^+) ⁺ 542.2992; gef. 542.2984.
HPLC-ESI-MS	m/z 543 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 565 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 581 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (606). (*rac*)-Epoxid **493** (50.4 mg, 0.2 mmol) in DMF (560 μl), DIPEA (30.8 μl , 0.18 mmol), Dipeptid **326** (70.1 mg, 0.22 mmol) als Lösung in DMF (623 μl), PyBOP (124.8 mg, 0.24 mmol), Diethylether (3.8 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:2). Man erhält 22.1 mg (24%) **606** als weißen Feststoff.



DC	$R_f = 0.28$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:2).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -43.8$ ($c = 0.08$, MeOH).
IR	ν_{max} (cm^{-1}) 3393, 3099, 3064, 3033, 2966, 2934, 2878, 2816, 1719, 1703, 1604, 1587, 1514, 1448, 1392, 1377, 1359, 1319, 1263, 1226, 1170, 1105, 843, 781, 746.
MS (EI)	m/z 554 (M^+), 522, 498, 463, 431, 387, 376, 350, 322, 290, 262, 254, 230, 206, 161, 113, 91, 86, 70, 69, 57.
HRMS (EI)	m/z ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$ (M^+) ⁺ 554.2628; gef. 554.2639.
HPLC-ESI-MS	m/z 555 ($\text{M}+\text{H}$) ⁺ , 577 ($\text{M}+\text{Na}$) ⁺ , 593 ($\text{M}+\text{K}$) ⁺ .

Tripeptid (607). (*rac*)-Epoxid **492** (24.2 mg, 0.1 mmol) in DMF (280 μl), DIPEA (15.4 μl , 0.09 mmol), Dipeptid **326** (35.1 mg, 0.11 mmol) als Lösung in DMF (312 μl), PyBOP (62.4 mg, 0.12 mmol), Diethylether (5.5 ml). Die Reinigung erfolgt mittels einer Kieselgelsäule (*n*-Hexan/Ethylacetat = 1:3). Man erhält 19.1 mg (32%) **607** als weißen Feststoff.



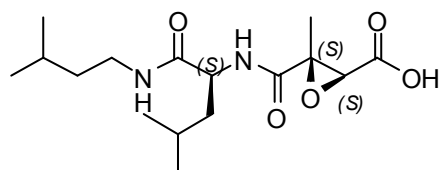
DC	$R_f = 0.31$ (<i>n</i> -Hexan/EtOAc = 1:3).
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -66.6$ ($c = 0.14$, MeOH).

IR	ν_{\max} (cm ⁻¹) 3091, 3067, 3033, 2961, 2925, 2881, 2855, 1731, 1638, 1617, 1534, 1458, 1445, 1394, 1380, 1362, 1320, 1281, 1230, 1185, 1155, 1107, 845.
MS (ESI)	m/z 519 (M+H) ⁺ , 436, 413, 391, 352, 324, 295, 279, 214, 151, 136.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₂₆ H ₃₅ N ₂ O ₉ (M+H) ⁺ 519.2341; gef. 519.2344.
HPLC-ESI-MS	m/z 519 (M+H) ⁺ , 541 (M+Na) ⁺ , 557 (M+K) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Entschützung der Tripeptide (608 – 616)

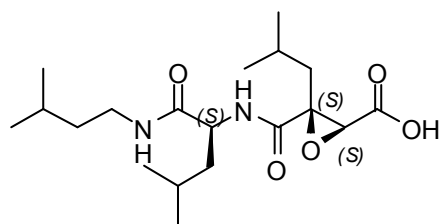
Zu einer Lösung von Tripeptid (0.05 mmol) in DCM (1.6 mmol, 105.0 μ l) wird bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre (Argon) langsam Triisopropylsilan (0.125 mmol, 25.6 μ l) zugetropft. Die Reaktionslösung wird für 5 min gerührt und anschließend Trifluoressigsäure (0.65 mmol, 51.2 μ l) über eine Spritzenpumpe (0.1 ml/0.5) zugegeben und für weitere 2 – 4 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Diethylether oder *n*-Hexan ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Diethylether (1.5 ml) oder *n*-Hexan (1.5 ml) gewaschen. Das Produkt wird zuerst am Hochvakuum für 24 h getrocknet, dann in Methanol aufgenommen, mit Wasser ausgefällt und lyophilisiert. Nach zweimaliger Lyophilisation, zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser gefolgt von Methanol/Wasser erhält man einen sauberen weißen Feststoff. Einzelne Tripeptide wurden für die biologische Testierung noch zusätzlich mittels präparativer HPLC (t_R = 9.0 min [15% bis 50% CH₃CN in 30 min]) gereinigt.

Tripeptid (608). Tripeptid **590** (19.5 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 μ l, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 μ l, 0.65 mmol), DCM (105 μ l, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 13.3 mg (81%) **608** als weißen Feststoff.



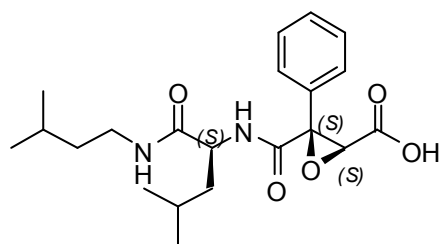
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +59.8$ (c = 0.07, MeOH).
MS (ESI)	m/z 329 (M+H) ⁺ , 324, 301, 279, 236, 257, 214, 198, 181, 173, 158, 141, 116.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₂₉ N ₂ O ₅ (M+H) ⁺ 329.2071; gef. 329.2068.
HPLC-ESI-MS	m/z 329 (M+H) ⁺ , 351 (M+Na) ⁺ , 367 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (609). Tripeptid **591** (21.3 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 μ l, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 μ l, 0.65 mmol), DCM (105 μ l, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 12.8 mg (69%) **609** als weißen Feststoff.



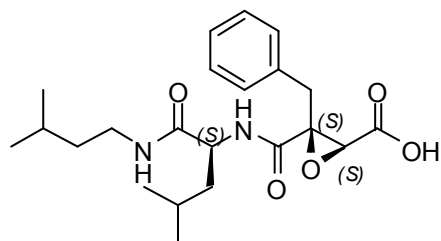
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +23.6$ (c = 0.08, MeOH).
MS (ESI) m/z 371 (M+H)⁺, 340, 284, 256, 240, 214, 181, 173, 158, 141, 125.
HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₉H₃₅N₂O₅ (M+H)⁺ 371.2540; gef. 371.2535.
HPLC-ESI-MS m/z 371 (M+H)⁺, 393 (M+Na)⁺, 509 (M+K)⁺.

Tripeptid (610). Tripeptid **592** (22.3 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 μ l, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 μ l, 0.65 mmol), DCM (105 μ l, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 14.8 mg (76%) **610** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +37.5$ (c = 0.08, MeOH).
MS (ESI) m/z 391 (M+H)⁺, 360, 310, 301, 289, 236, 227, 214, 181, 173, 165, 116.
HRMS (ESI) m/z ber. für C₂₁H₃₁N₂O₅ (M+H)⁺ 391.2227; gef. 391.2225.
HPLC-ESI-MS m/z 391 (M+H)⁺, 413 (M+Na)⁺, 429 (M+K)⁺.

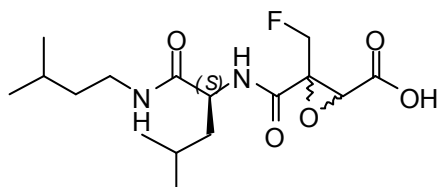
Tripeptid (611). Tripeptid **593** (23.0 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 μ l, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 μ l, 0.65 mmol), DCM (105 μ l, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 15.7 mg (78%) **611** als weißen Feststoff.



Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +53.3$ (c = 0.09, MeOH).

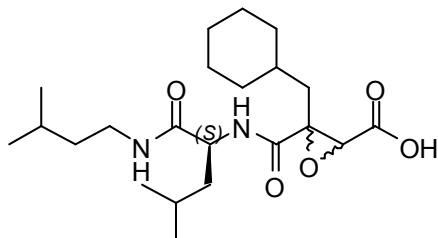
MS (ESI)	m/z 405 (M+H) ⁺ , 374, 343, 318, 290, 271, 236, 214, 198, 173, 158, 141, 125.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₂₂ H ₃₃ N ₂ O ₅ (M+H) ⁺ 405.2384; gef. 405.2382.
HPLC-ESI-MS	m/z 405 (M+H) ⁺ , 427 (M+Na) ⁺ , 443 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (612). Tripeptid **594** (20.1 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 µl, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 µl, 0.65 mmol), DCM (105 µl, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 11.4 mg (66%) **612** als gelblichen Feststoff.



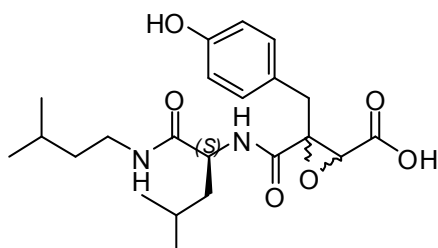
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -23.8$ (c = 0.04, MeOH).
MS (ESI)	m/z 347 (M+H) ⁺ , 329, 271, 260, 232, 214, 181, 173, 158, 141, 125.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₂₈ F ₁ N ₂ O ₅ (M+H) ⁺ 347.1976; gef. 347.1970.
HPLC-ESI-MS	m/z 347 (M+H) ⁺ , 369 (M+Na) ⁺ , 385 (M+K) ⁺ .

Tripeptid (613). Tripeptid **595** (23.3 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 µl, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 µl, 0.65 mmol), DCM (105 µl, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 13.3 mg (65%) **613** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -23.3$ (c = 0.06, MeOH).
MS (ESI)	m/z 411 (M+H) ⁺ , 377, 324, 240, 184, 173, 158.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₂₂ H ₃₉ N ₂ O ₅ (M+H) ⁺ 411.2853; gef. 411.2853.
HPLC-ESI-MS	m/z 411 (M+H) ⁺ , 433 (M+Na) ⁺ , 449 (M+K) ⁺ .

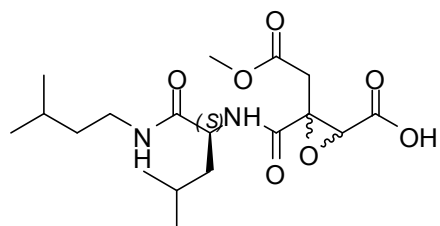
Tripeptid (614). Tripeptid **596** (23.8 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 µl, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 µl, 0.65 mmol), DCM (105 µl, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 14.9 mg (71%) **614** als weißen



Feststoff.

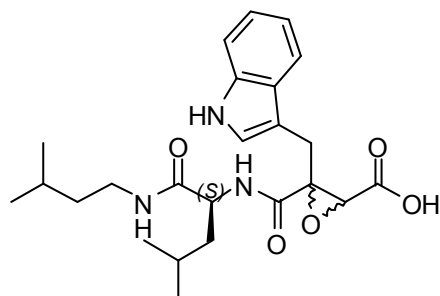
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +16.7$ ($c = 0.21$, MeOH).
MS (ESI)	m/z 421 ($M+H$) ⁺ , 377, 343, 308, 271, 235, 198, 173, 163, 141.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $C_{22}H_{33}N_2O_6$ ($M+H$) ⁺ 421.2333; gef. 421.2330.
HPLC-ESI-MS	m/z 421 ($M+H$) ⁺ , 443 ($M+Na$) ⁺ , 459 ($M+K$) ⁺ .

Tripeptid (615). Tripeptid **597** (22.1 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 μ l, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 μ l, 0.65 mmol), DCM (105 μ l, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 12.2 mg (63%) **615** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -26.9$ ($c = 0.04$, MeOH).
MS (ESI)	m/z 386 (M) ⁺ , 371, 356, 343, 314, 271, 228, 186, 115.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $C_{18}H_{30}N_2O_7$ (M) ⁺ 386.2053; gef. 386.2062.
HPLC-ESI-MS	m/z 387 ($M+H$) ⁺ , 409 ($M+Na$) ⁺ , 425 ($M+K$) ⁺ .

Tripeptid (616). Tripeptid **598** (32.7 mg, 0.05 mmol), Triisopropylsilan (25.6 μ l, 0.125 mmol), Trifluoressigsäure (51.2 μ l, 0.65 mmol), DCM (105 μ l, 1.6 mmol). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH_3CN /Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 11.9 mg (54%) **616** als bräunlichen Feststoff.

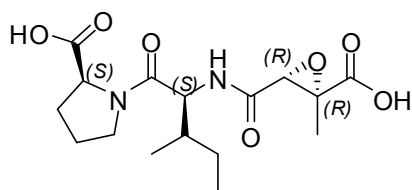


Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -91.8$ ($c = 0.15$, MeOH).
MS (ESI)	m/z 444 ($M+H$) ⁺ , 411, 358, 274, 257, 181, 173, 158.
HRMS (ESI)	m/z ber. für $C_{24}H_{34}N_3O_5$ ($M+H$) ⁺ 444.2493; gef. 444.2486.
HPLC-ESI-MS	m/z 444 ($M+H$) ⁺ , 466 ($M+Na$) ⁺ , 482 ($M+K$) ⁺ .

Allgemeine Synthesevorschrift für die Entschützung der Tripeptide (617 – 626)

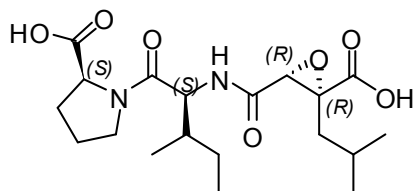
Zu einer Lösung von Tripeptid (0.05 mmol, 1.0 eq) in THF (0.6 ml/0.1 mmol) wird bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre (Argon) über eine Spritzenpumpe (0.1 ml/0.5 h) eine 0.5 M Lithiumhydroxid-Lsg. (0.3 ml, 0.15 mmol, 3.0 eq) zugetropft. Nach 3 - 4 h Reaktionszeit (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung mit 1 M HCl-Lsg. auf pH 2 – 3 titriert und für weitere 5 min gerührt. Die trübe Lösung wird dreimal mit Ethylacetat (3.0 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Rohprodukt wird mittels Diethylether oder *n*-Hexan ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert und mit Diethylether (2.0 ml) oder *n*-Hexan (2.0 ml) gewaschen. Das Produkt wird zuerst am Hochvakuum für 24 h getrocknet, dann in Methanol aufgenommen, mit Wasser ausgefällt und lyophilisiert. Nach zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser gefolgt von Methanol/Wasser erhält man einen sauberen weißen Feststoff. Einzelne Tripeptide wurden für die biologische Testierung noch zusätzlich mittels präparativer HPLC (t_R = 8.0 min [15% bis 50% CH₃CN in 30 min]) gereinigt.

Tripeptid (617). Tripeptid **599** (23.7 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq) in THF (0.3 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.3 ml, 0.15 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 11.2 mg (63%) **617** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -88.9$ (c = 0.09, MeOH).
MS (ESI)	m/z 357 (M+H) ⁺ , 343, 288, 272, 246, 214, 206, 173, 163, 149.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₁₆ H ₂₅ N ₂ O ₇ (M+H) ⁺ 357.1656; gef. 357.1656.
HPLC-ESI-MS	m/z 357 (M+H) ⁺ , 379 (M+Na) ⁺ , 395 (M+K) ⁺ .

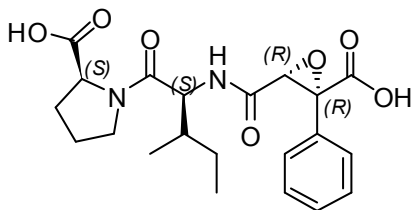
Tripeptid (618). Tripeptid **600** (25.1 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq) in THF (0.3 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.3 ml, 0.15 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 13.7 mg (69%) **618** als weißen Feststoff.



Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -35.3$ (c = 0.08, MeOH).
MS (ESI)	m/z 399 (M+H) ⁺ , 343, 270, 214, 206, 173, 163, 141.
HRMS (ESI)	m/z ber. für C ₁₉ H ₃₁ N ₂ O ₇ (M+H) ⁺ 399.2125; gef. 399.2127.

HPLC-ESI-MS m/z 399 (M+H)⁺, 421 (M+Na)⁺, 437 (M+K)⁺.

Tripeptid (619). Tripeptid **601** (26.1 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq) in THF (0.3 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.3 ml, 0.15 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 14.8 mg (71%) **619** als weißen Feststoff.



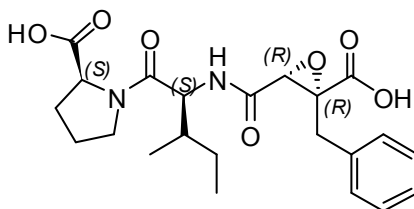
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -111.2$ (c = 0.09, MeOH).

MS (ESI) m/z 419 (M+H)⁺, 385, 363, 341, 319, 299, 257, 214, 206, 173, 158.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₂₁H₂₇N₂O₇ (M+H)⁺ 419.1812; gef. 419.1827.

HPLC-ESI-MS m/z 419 (M+H)⁺, 441 (M+Na)⁺, 457 (M+K)⁺.

Tripeptid (620). Tripeptid **602** (26.8 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq) in THF (0.3 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.3 ml, 0.15 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 13.2 mg (61%) **620** als weißen Feststoff.



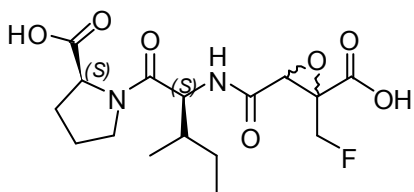
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -25.7$ (c = 0.07, MeOH).

MS (ESI) m/z 433 (M+H)⁺, 400, 391, 352, 324, 301, 279, 264, 214, 151, 135.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₂₂H₂₉N₂O₇ (M+H)⁺ 433.1983; gef. 433.1967.

HPLC-ESI-MS m/z 433 (M+H)⁺, 455 (M+Na)⁺, 471 (M+K)⁺.

Tripeptid (621). Tripeptid **603** (23.9 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq) in THF (0.3 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.3 ml, 0.15 mmol, 3.0 eq). Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 11.1 mg (59%) **621** als weißen Feststoff.



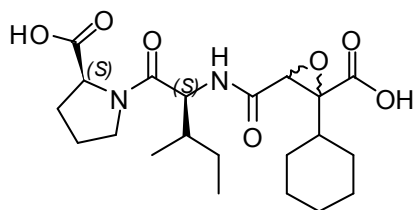
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -22.7$ (c = 0.05, MeOH).

MS (ESI) m/z 375 (M+H)⁺, 343, 329, 271, 232, 207, 198, 173, 163, 151, 149.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₆H₂₄F₁N₂O₇ (M+H)⁺ 375.1562; gef. 375.1561.

HPLC-ESI-MS m/z 375 (M+H)⁺, 397 (M+Na)⁺, 413 (M+K)⁺.

Tripeptid (622). Tripeptid **604** (13.2 mg, 0.025 mmol, 1.0 eq) in THF (0.15 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.15 ml, 0.075 mmol, 3.0 eq).



Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 7.3 mg (69%) **622** als weißen Feststoff.

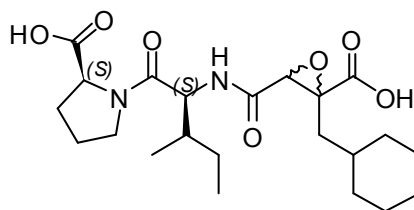
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -41.3$ (c = 0.05, MeOH).

MS (ESI) m/z 425 (M+H)⁺, 400, 368, 343, 308, 299, 271, 243, 239, 198, 173, 163, 158, 141, 125.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₂₁H₃₃N₂O₇ (M+H)⁺ 425.2295; gef. 425.2299.

HPLC-ESI-MS m/z 425 (M+H)⁺, 447 (M+Na)⁺, 463 (M+K)⁺.

Tripeptid (623). Tripeptid **605** (13.6 mg, 0.025 mmol, 1.0 eq) in THF (0.15 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.15 ml, 0.075 mmol, 3.0 eq).



Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 6.9 mg (63%) **623** als weißen Feststoff.

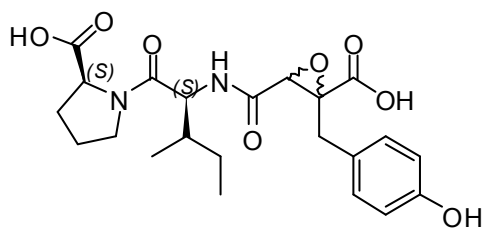
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -54.3$ (c = 0.04, MeOH).

MS (ESI) m/z 439 (M+H)⁺, 382, 343, 338, 310, 294, 278, 257, 228, 206, 198, 173, 163, 158, 141, 125.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₂₂H₃₅N₂O₇ (M+H)⁺ 439.2438; gef. 439.2438.

HPLC-ESI-MS m/z 449 (M+H)⁺, 471 (M+Na)⁺, 487 (M+K)⁺.

Tripeptid (624). Tripeptid **606** (27.6 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq) in THF (0.3 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.3 ml, 0.15 mmol, 3.0 eq). Die



Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (2/10). Man erhält 14.1 mg (63%) **624** als weißen Feststoff.

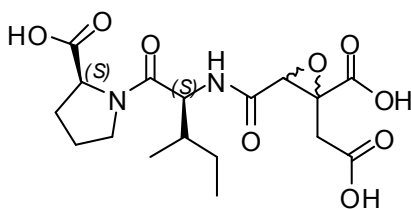
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -50.9$ (c = 0.06, MeOH).

MS (ESI) m/z 449 (M+H)⁺, 413, 343, 271, 249, 227, 198, 163, 141, 136, 120.436, 419, 376, 345, 321, 288, 260, 243, 203, 187, 149, 135, 107, 73, 44.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₂₅H₃₆N₂O₈ (M)⁺ 492.2471; gef. 492.2466.

HPLC-ESI-MS m/z 493 (M+H)⁺, 515 (M+Na)⁺, 531 (M+K)⁺.

Tripeptid (625). Tripeptid **607** (12.9 mg, 0.025 mmol, 1.0 eq) in THF (0.15 ml), 0.5 M Lithiumhydroxid in H₂O (0.15 ml, 0.075 mmol, 3.0 eq).



Die Reinigung erfolgt mittels zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (1/10) gefolgt von Methanol/Wasser (1/10). Man erhält 5.4 mg (54%) **625** als weißen Feststoff.

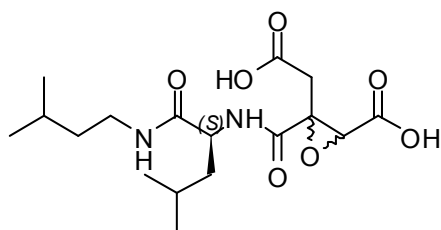
Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -22.9$ (c = 0.03, MeOH).

MS (ESI) m/z 401 (M+H)⁺, 369, 347, 329, 304, 260, 232, 214, 181, 173, 158, 141, 116.

HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₇H₂₅N₂O₉ (M+H)⁺ 401.1554; gef. 401.1550.

HPLC-ESI-MS m/z 401 (M+H)⁺, 423 (M+Na)⁺, 439 (M+K)⁺.

Tripeptid (626). Zu einer Lösung von Tripeptid **615** (12.9 mg, 0.025 mmol, 1.0 eq) in THF



(0.15 ml) wird bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre (Argon) über eine Spritzenpumpe (0.1 ml/0.5 h) eine 0.5 M Lithiumhydroxid-Lsg. (0.15 ml, 0.075 mmol, 3.0 eq) zugetropft. Nach 3 - 4 h Reaktionszeit wird die Reaktionslösung mit 1 M HCl-Lsg. auf pH 2 – 3 titriert

und für weitere 5 min gerührt. Die trübe Lösung wird dreimal mit Ethylacetat (2.0 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Rohprodukt wird mittels Diethylether oder *n*-Hexan ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert und mit Diethylether (2.0 ml) oder *n*-Hexan (2.0 ml) gewaschen. Das Produkt wird zuerst am Hochvakuum für 24 h getrocknet, dann in Methanol aufgenommen, mit Wasser ausgefällt und lyophilisiert. Nach zweimaliger Lyophilisation zuerst mit einem Gemisch aus CH₃CN/Wasser (2/8) gefolgt von Methanol/Wasser (3/9) erhält man einen sauberen weißen Feststoff. Man erhält 5.4 mg (54%) **626** als weißen Feststoff.

MS (ESI) m/z 373 (M+H)⁺, 357, 335, 288, 260, 214, 173, 158.

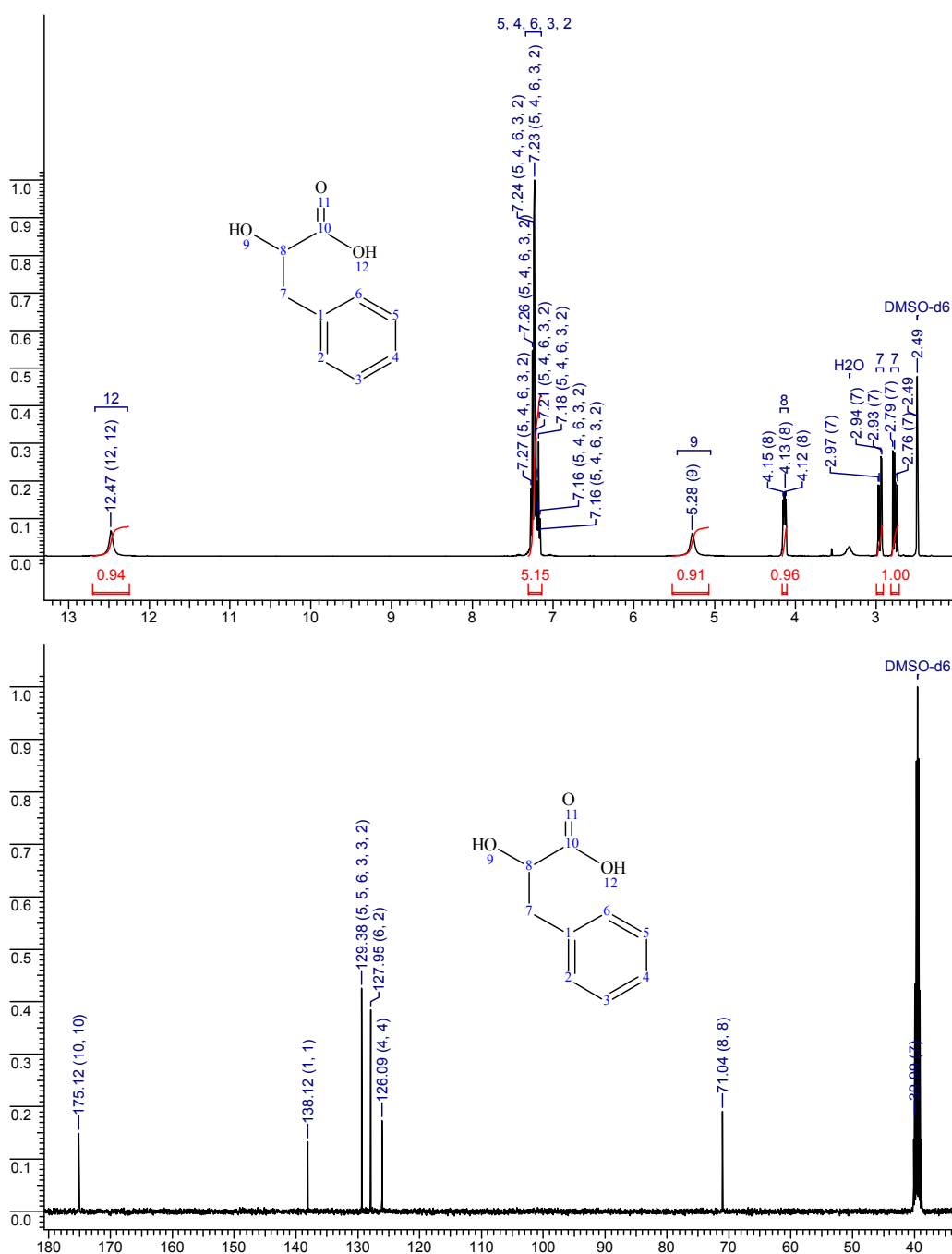
HRMS (ESI) m/z ber. für C₁₇H₂₉N₂O₇ (M+H)⁺ 373.1969; gef. 373.1969.

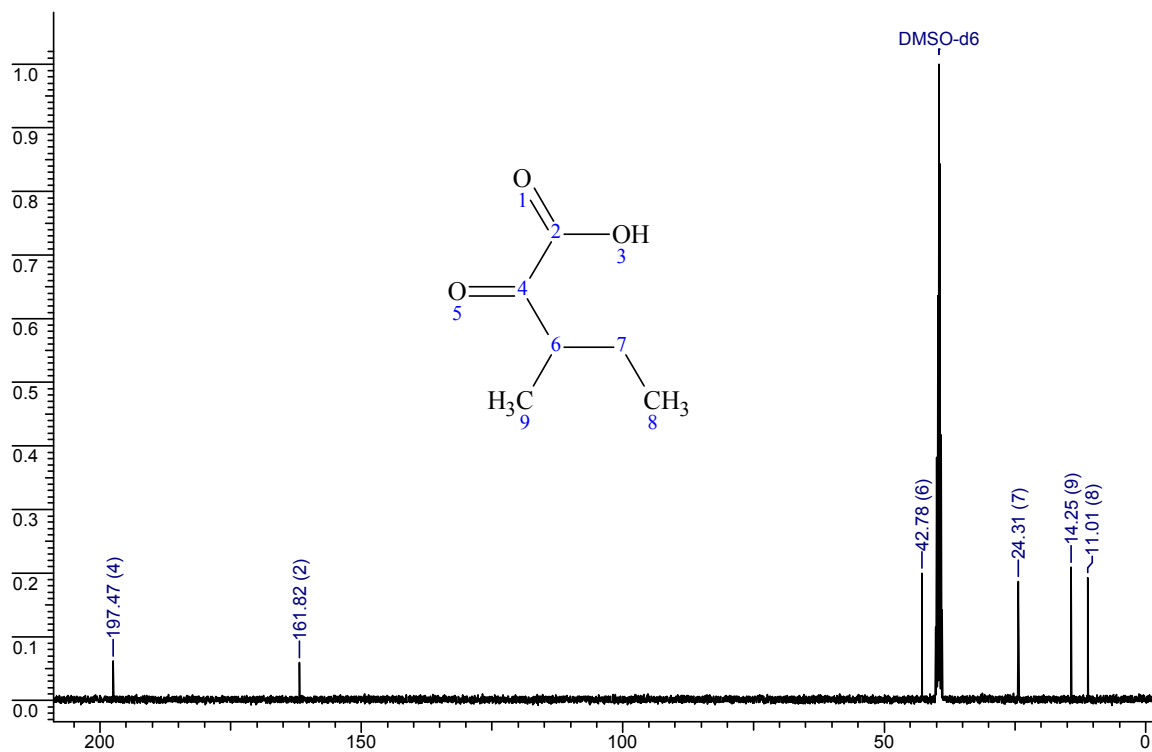
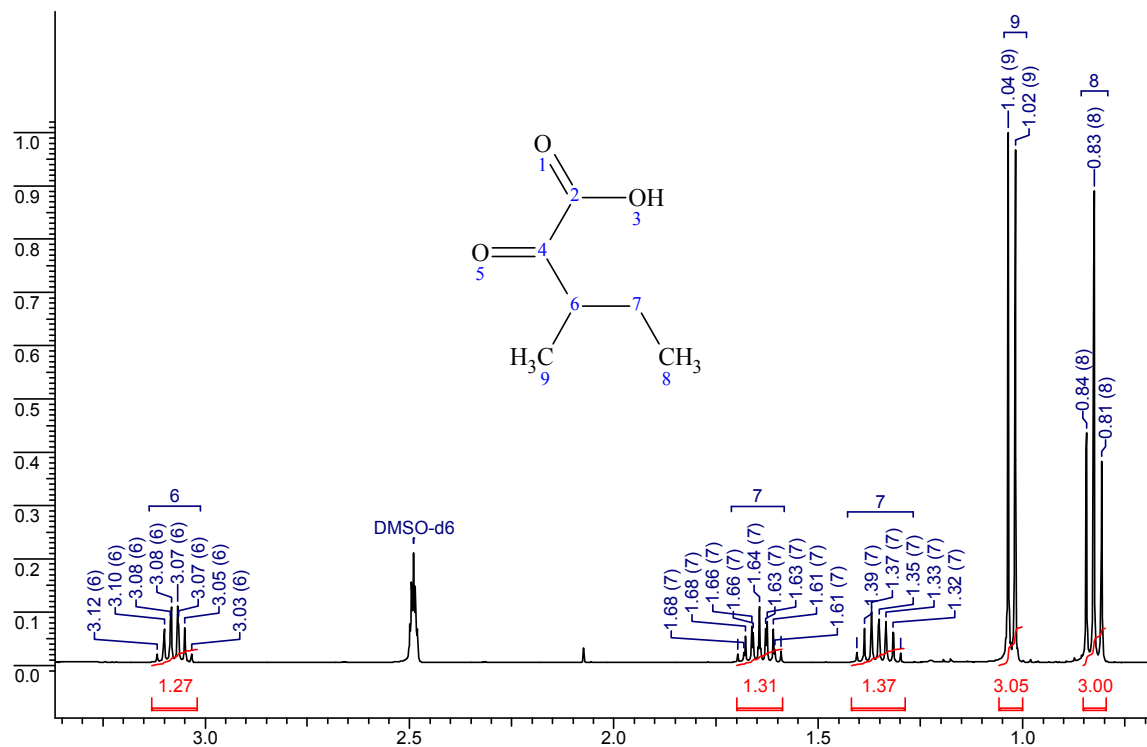
HPLC-ESI-MS m/z 373 (M+H)⁺, 395 (M+Na)⁺, 411 (M+K)⁺.

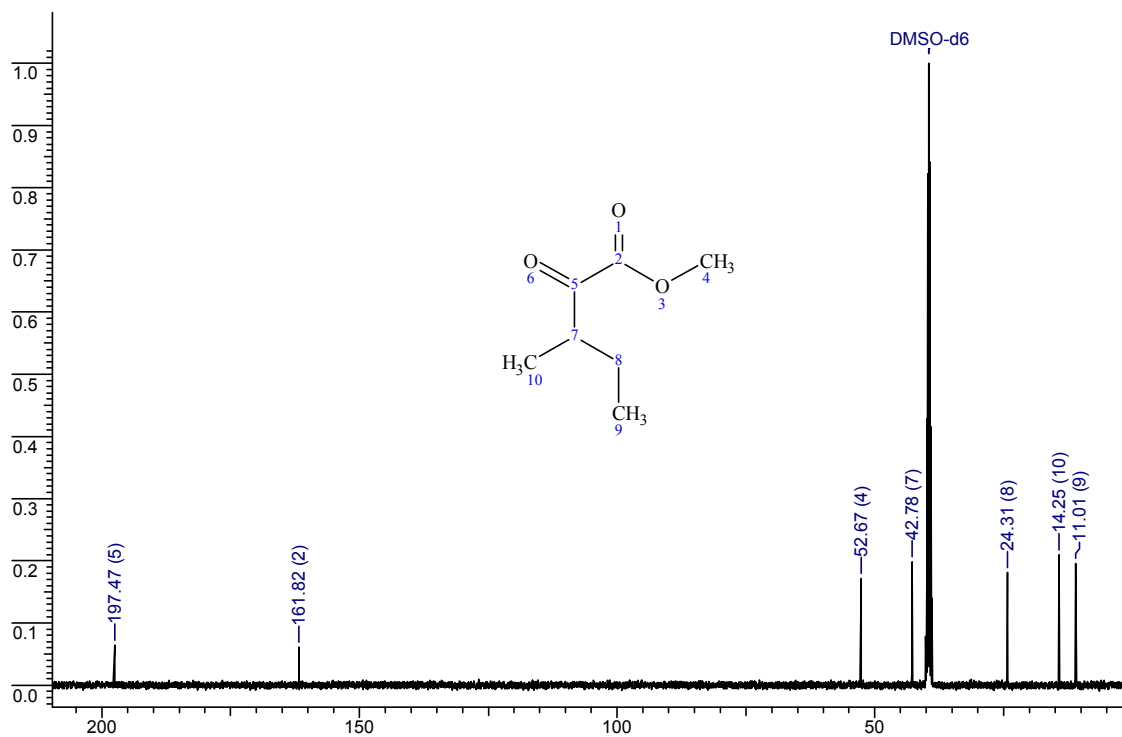
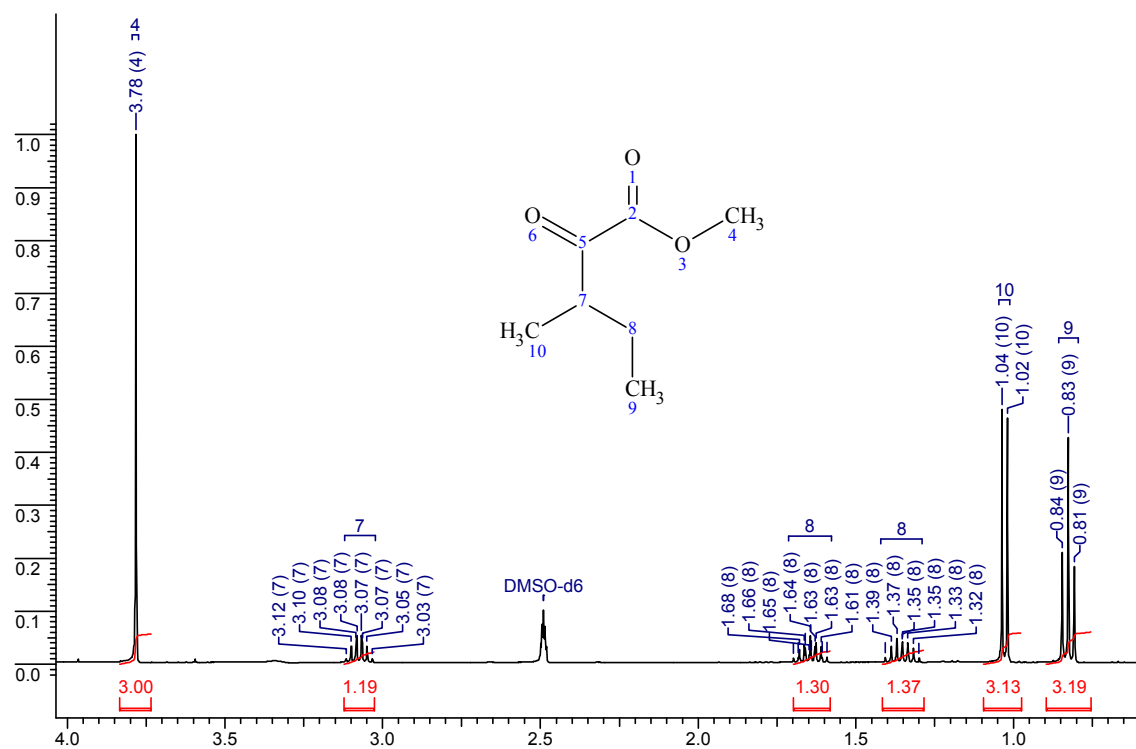
6.6 NMR-Spektren von ausgewählten synthetischen Intermediaten und *E64c-like*- bzw. *CA028-like*-Tripeptiden

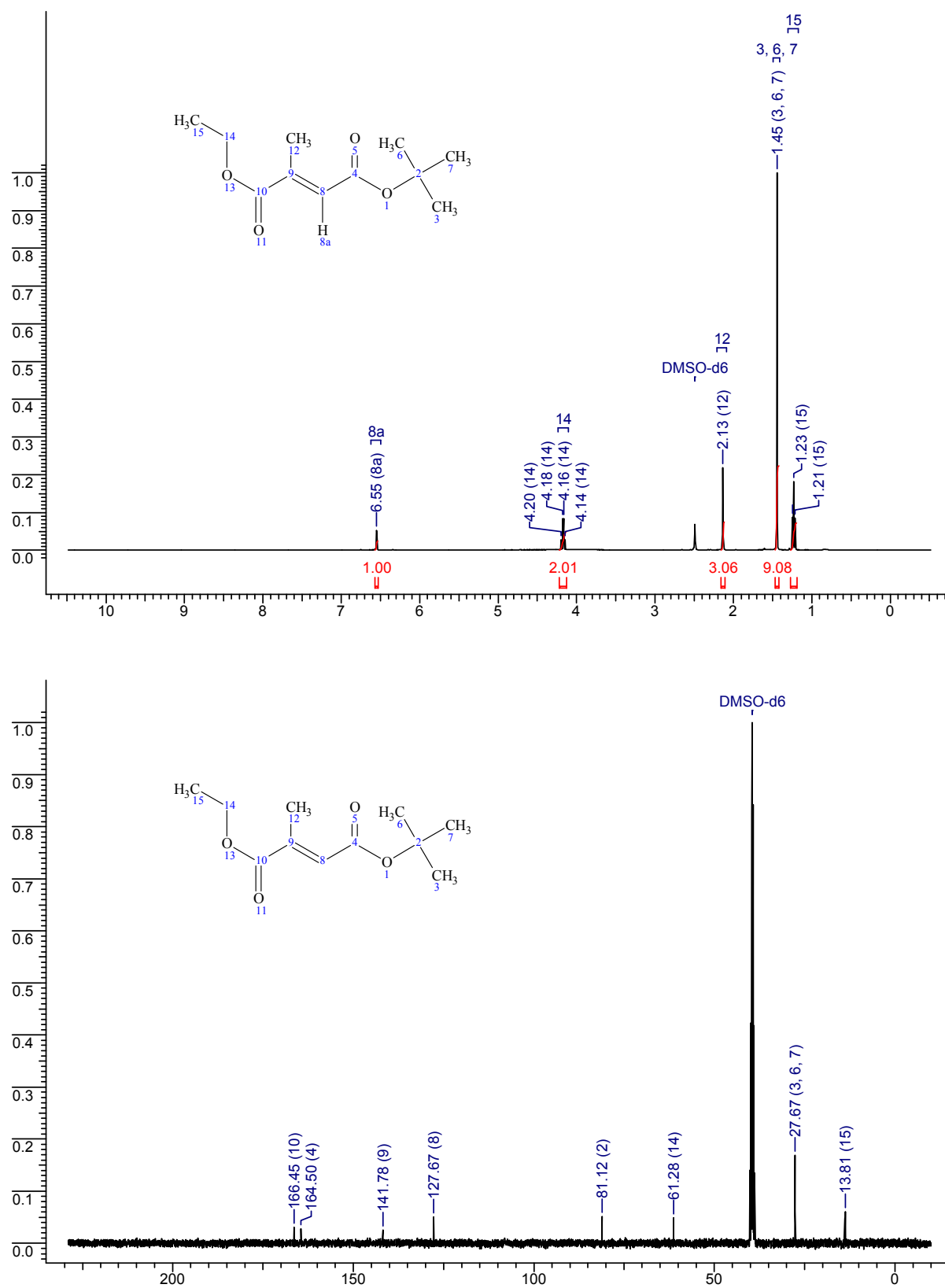
Aufgrund des umfangreichen Spektrums an Verbindungen ist es nicht möglich alle NMR- und HPLC-ESI-MS Spektren aufzuführen. Für jede Substanz- bzw. Verbindungs-Bibliothek wird daher exemplarisch ein Spektrensatz angegeben. Die Spektren sind kronologisch anhand ihres funktionellen Aufbaus bzw. Syntheseabschnittes aufgeführt.

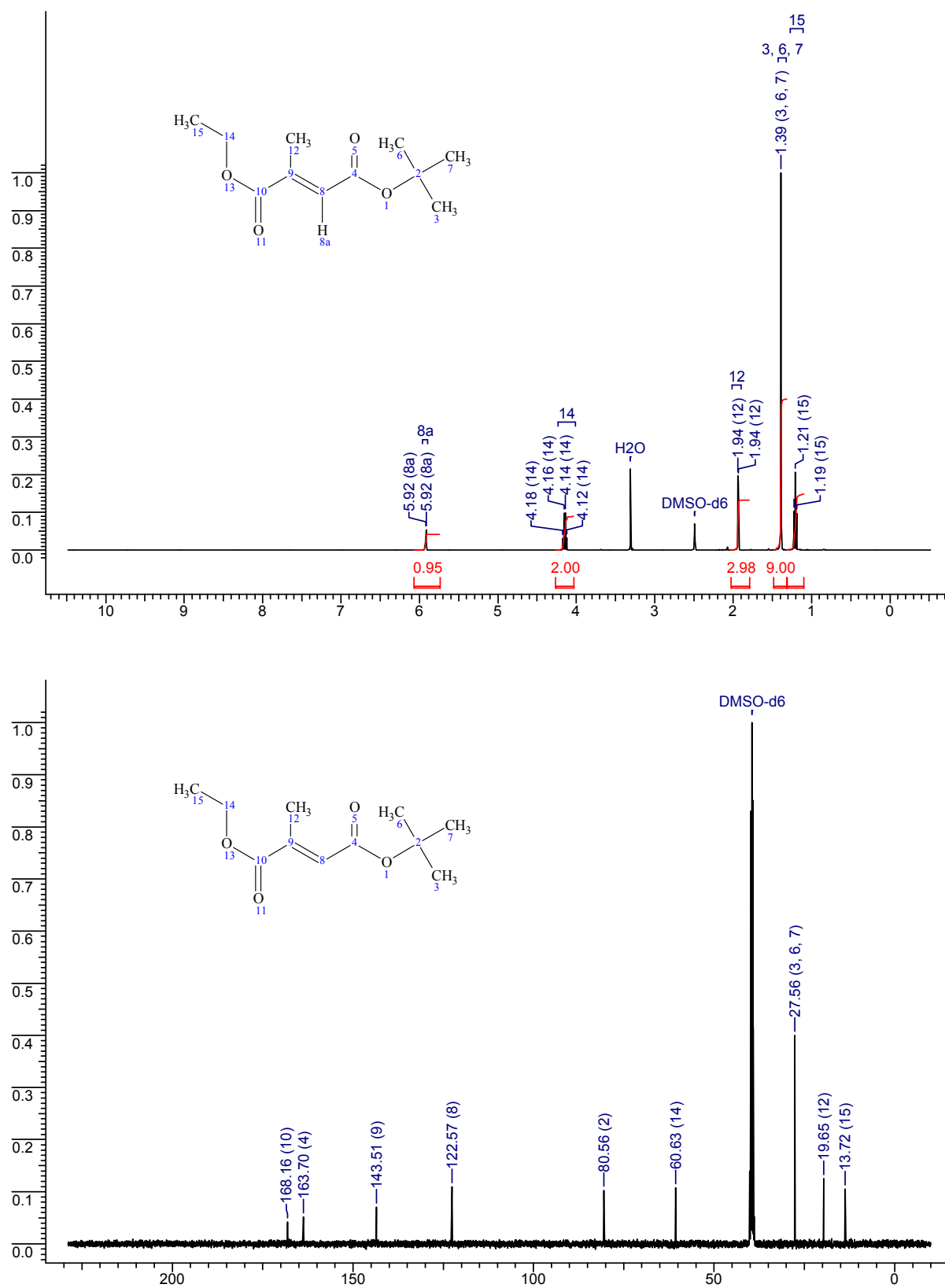
6.6.1 ^1H - und ^{13}C -NMR: (*S*)-2-Hydroxy-Phe-OH (346)

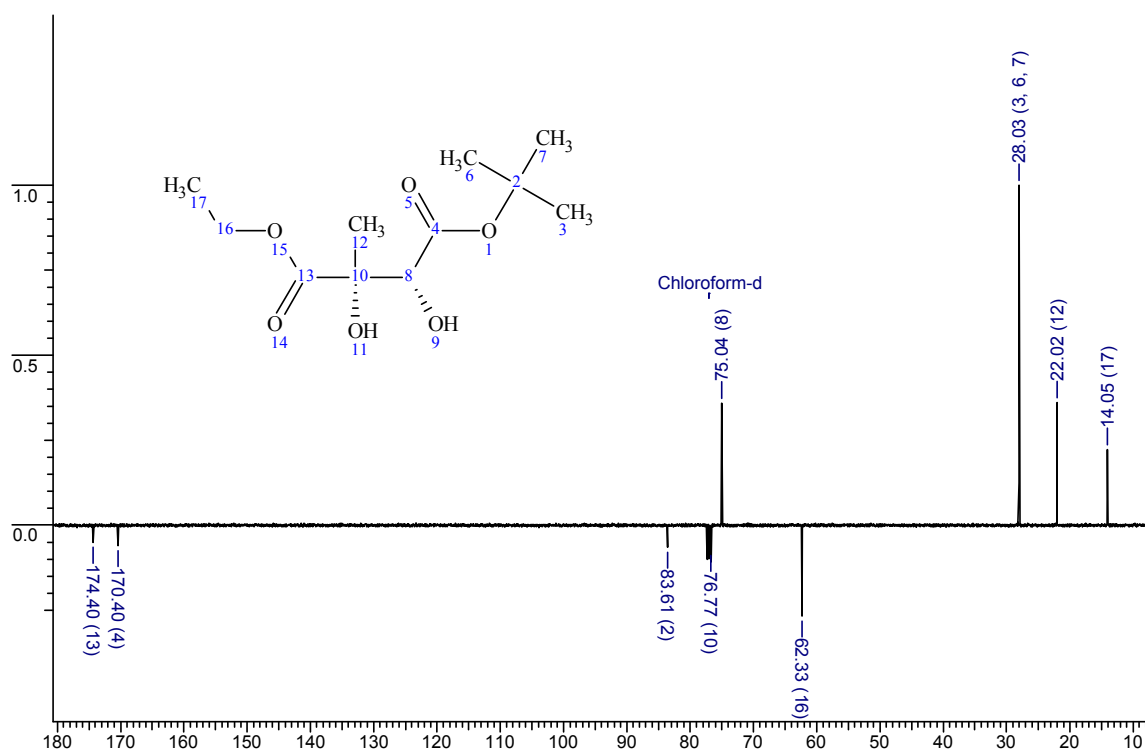
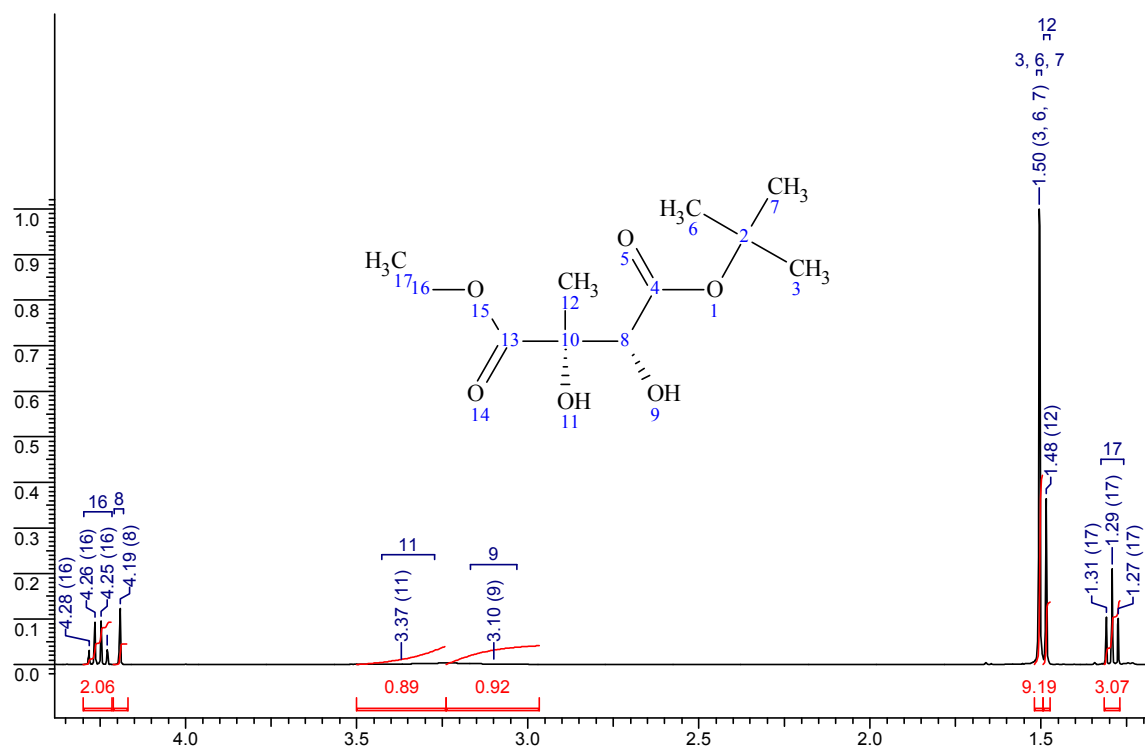


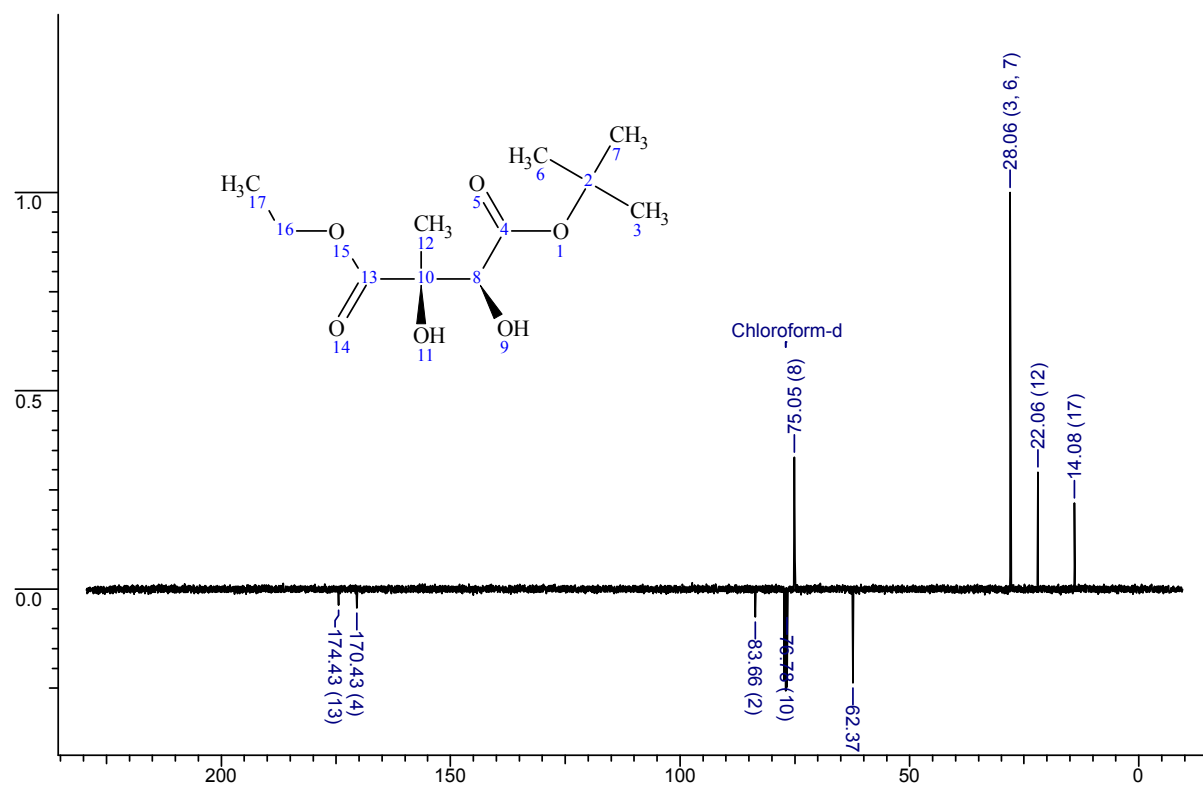
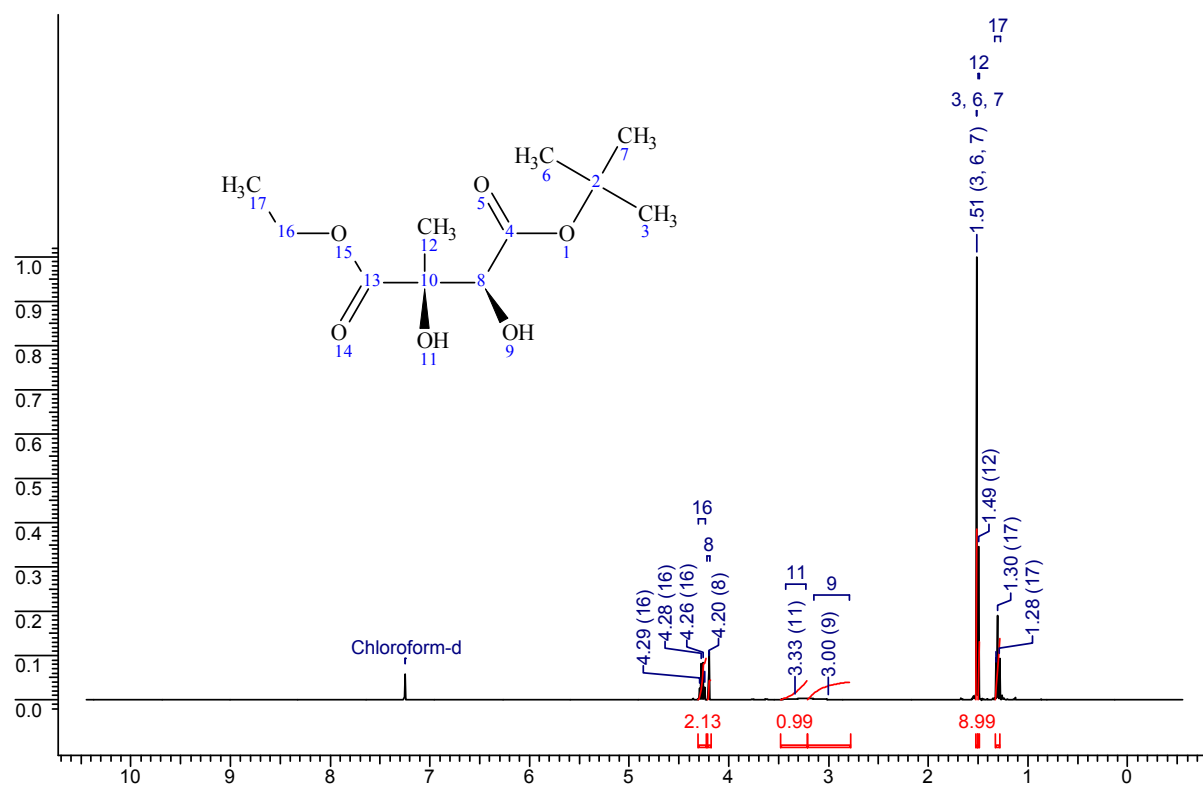
6.6.2 ^1H - und ^{13}C -NMR: 2-Oxo-Ile-OH (370)

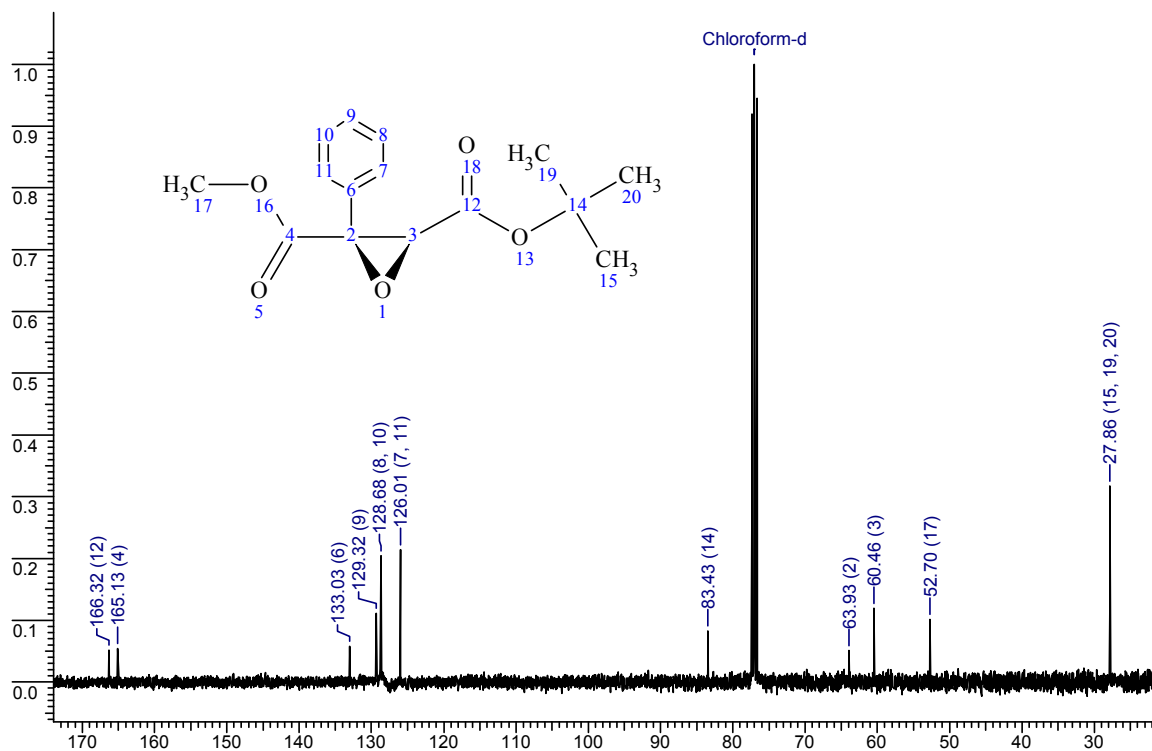
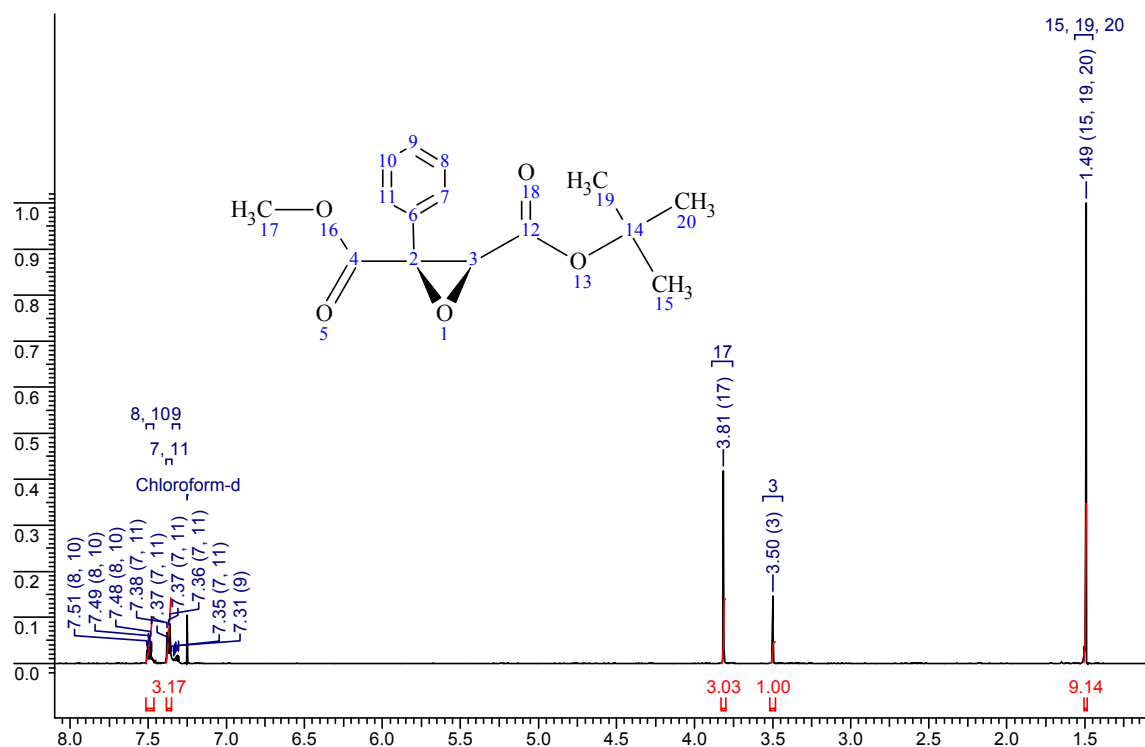
6.6.3 ^1H - und ^{13}C -NMR: 2-Oxo-Ile-OMe (392)

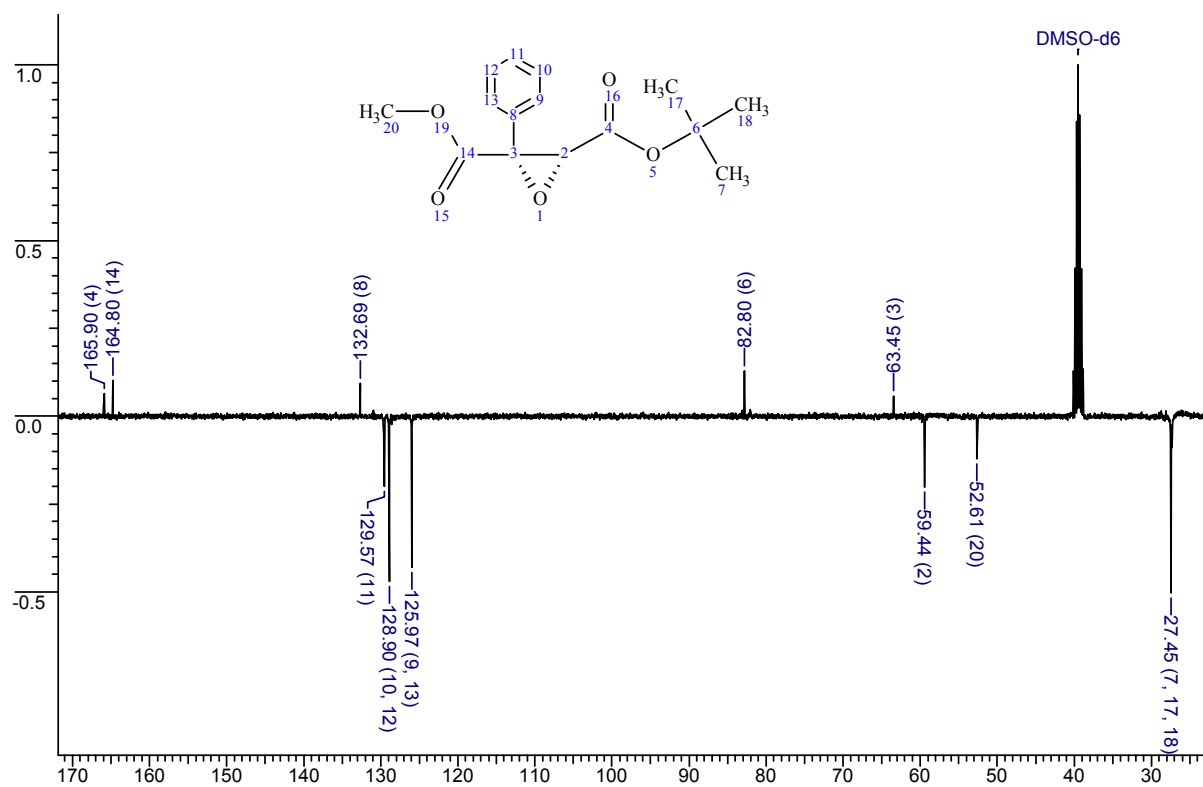
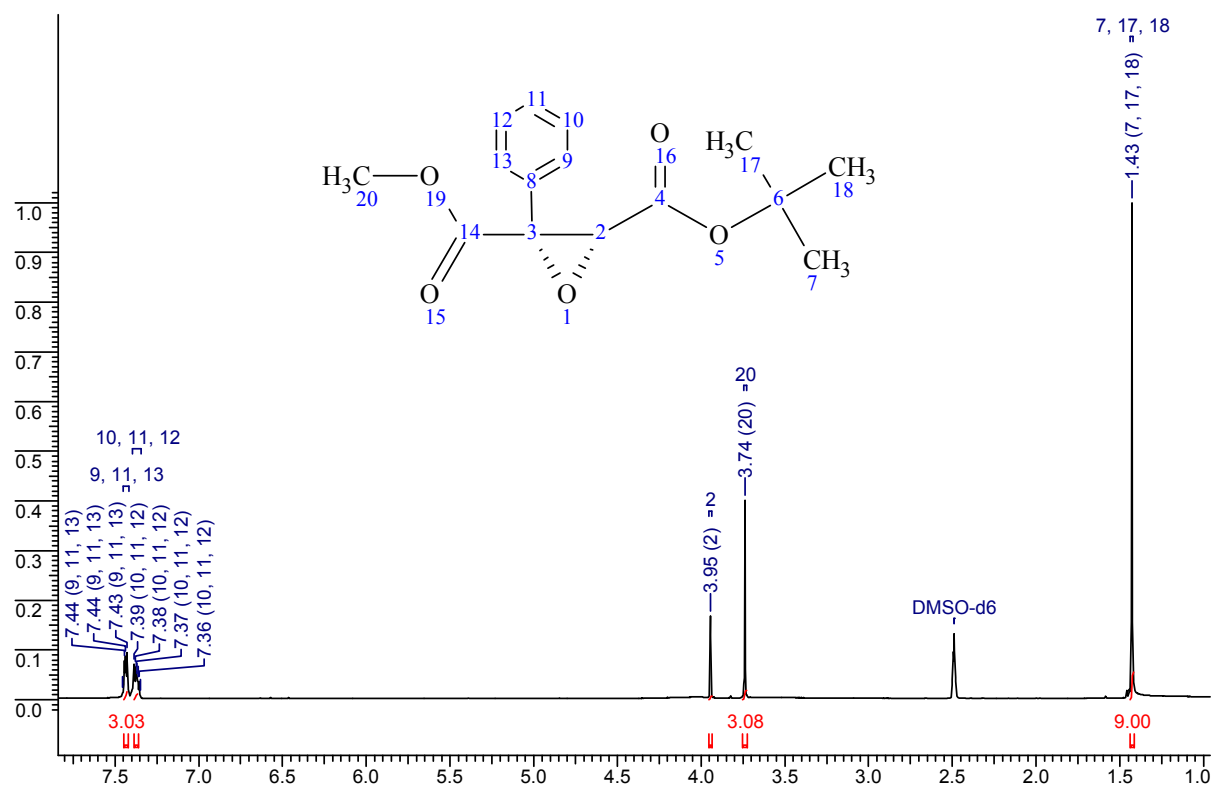
6.6.4 ^1H - und ^{13}C -NMR: (*E*)-Alken-Ala (404)

6.6.5 ^1H -, und ^{13}C -NMR: (Z)-Alken-Ala (421)

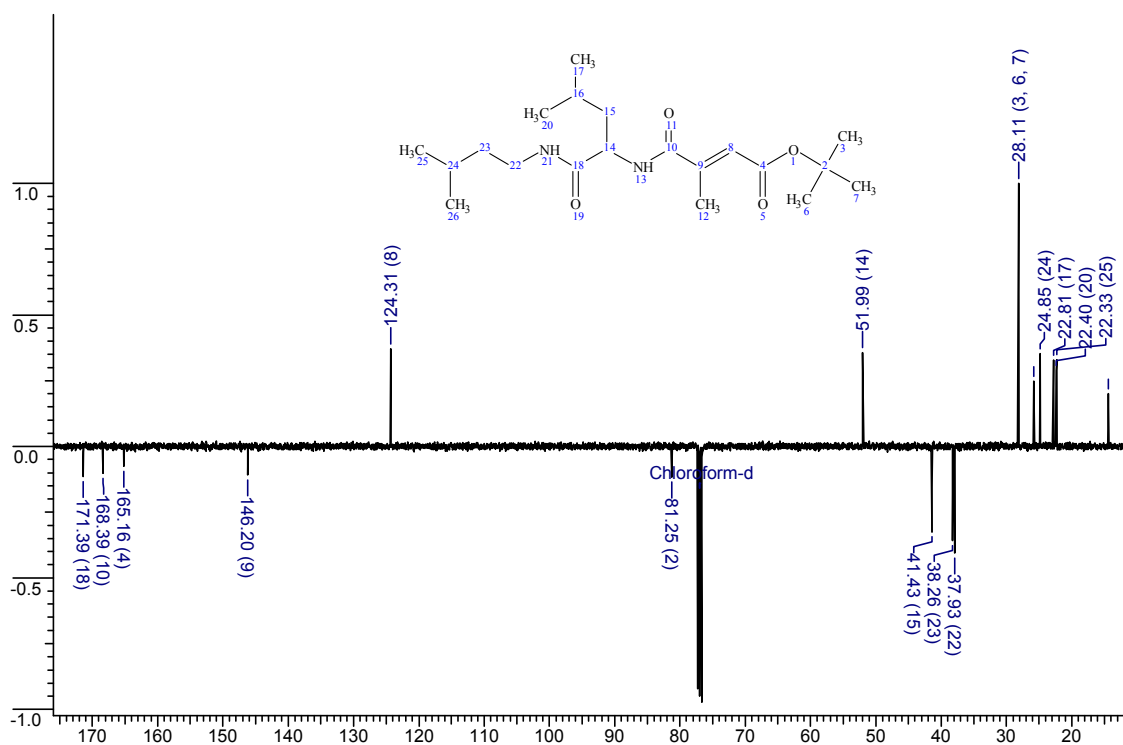
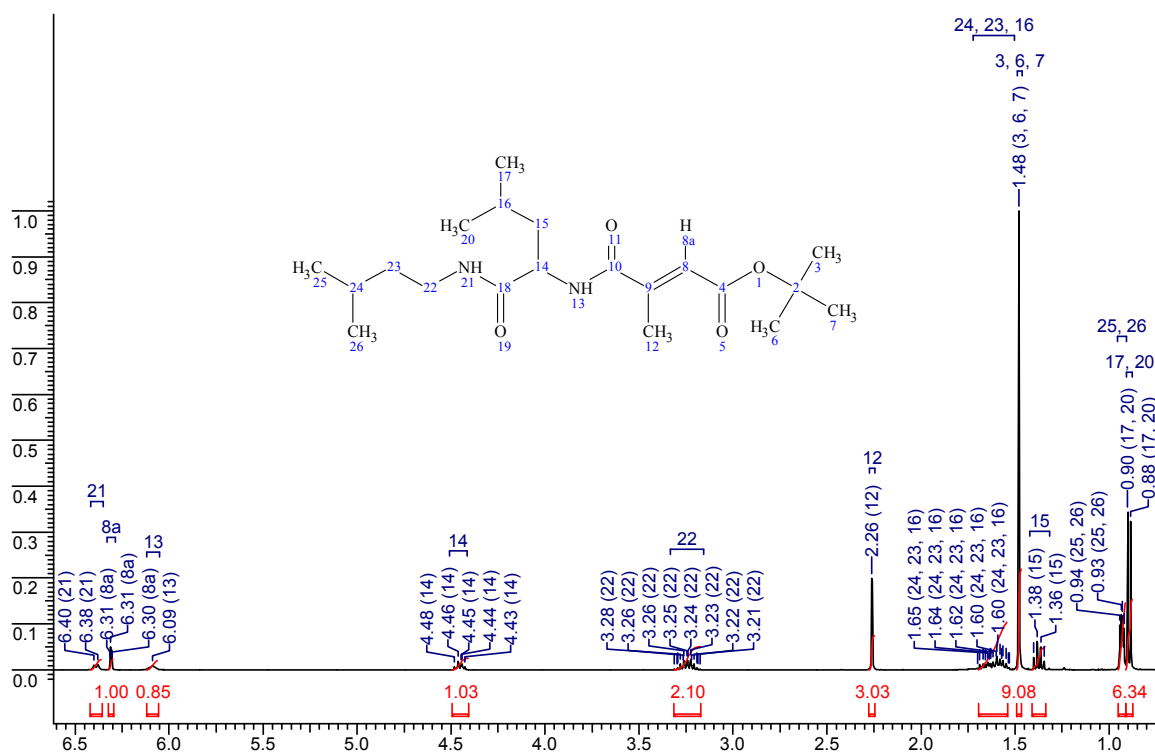
6.6.6 ^1H - und ^{13}C -NMR: (*S,S*)-Diol-Ala (454)

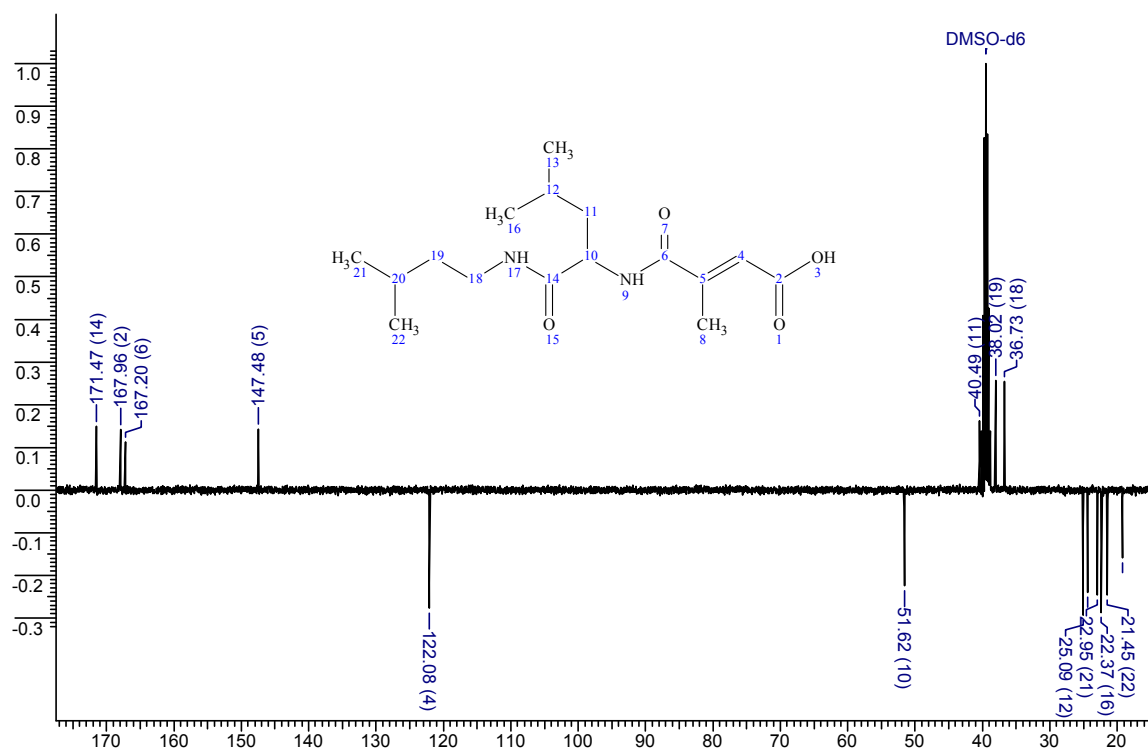
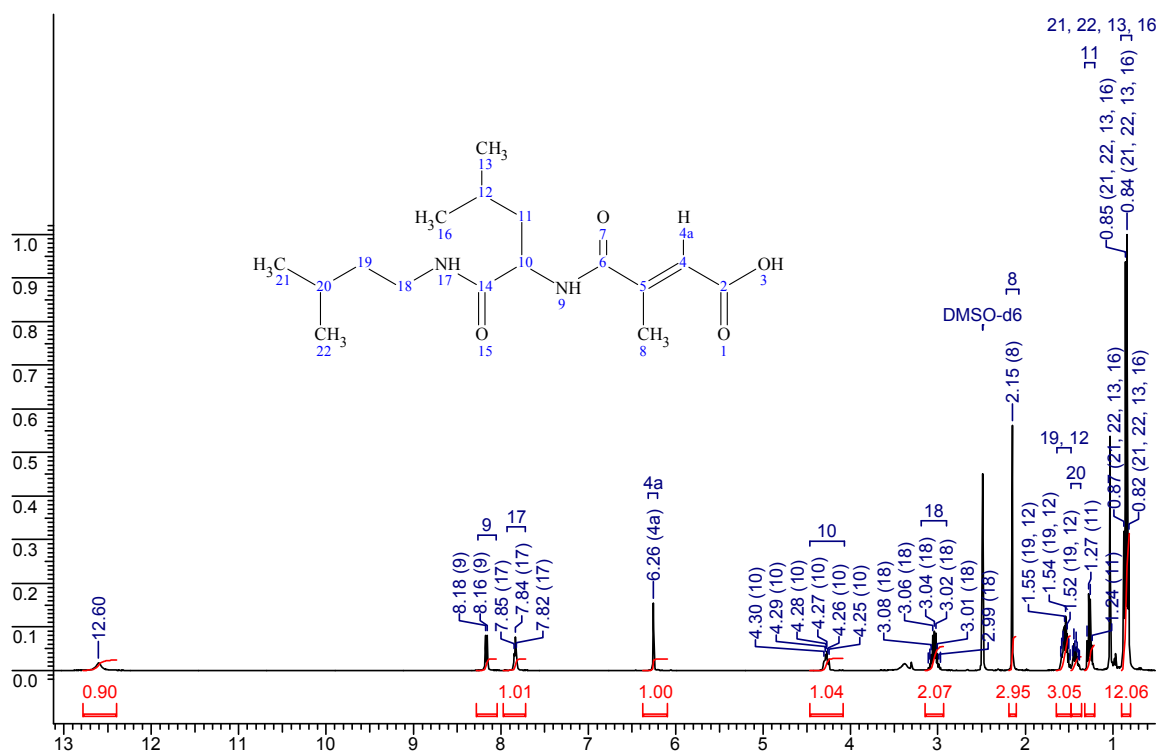
6.6.7 ^1H - und ^{13}C -NMR: (*R,R*)-Diol-Ala (458)

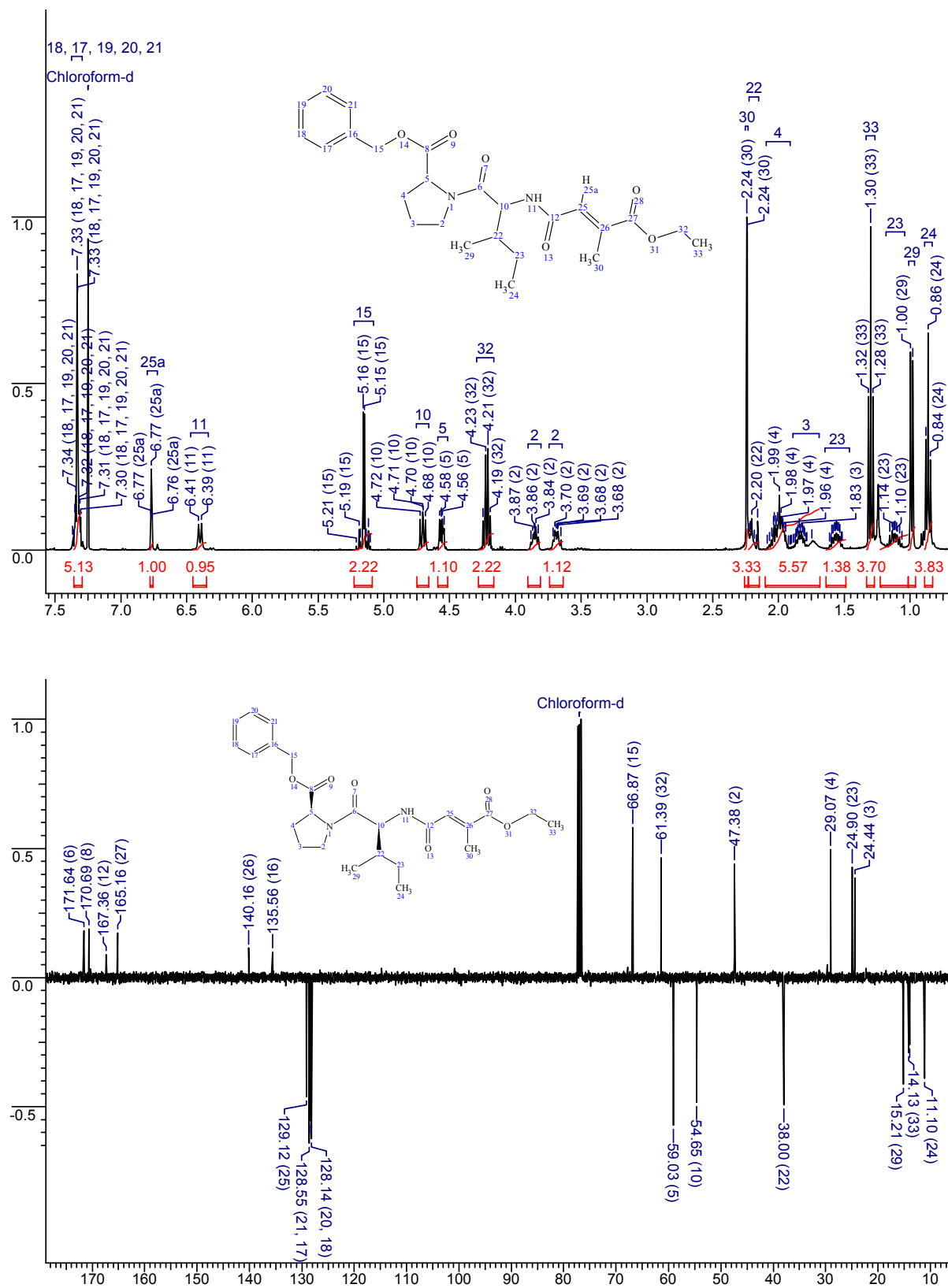
6.6.8 ^1H - und ^{13}C -NMR: (*S,S*)-Epoxy-Phg (462)

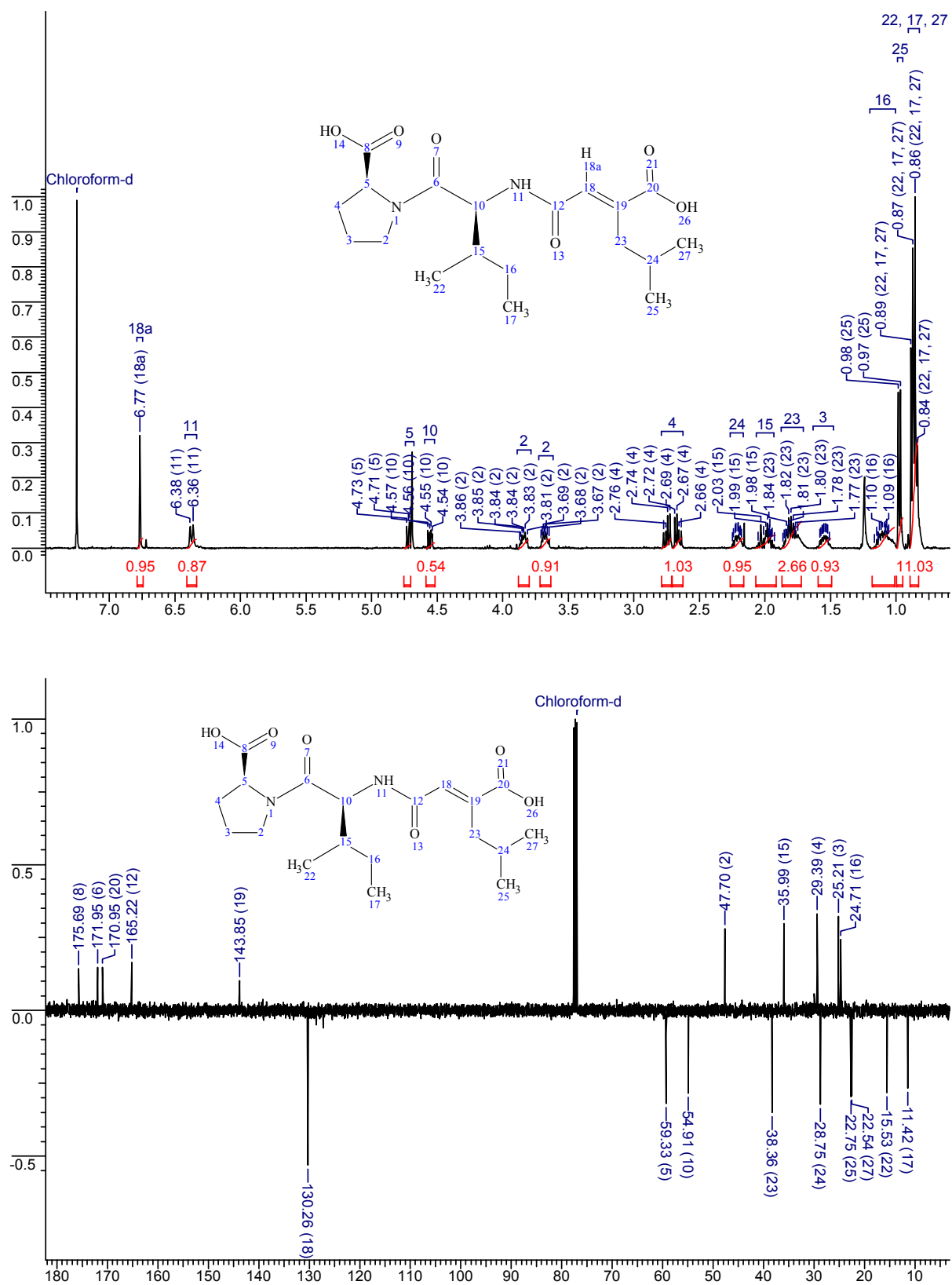
6.6.9 ^1H - und ^{13}C -NMR: (*R,R*)-Epoxy-Phg (463)

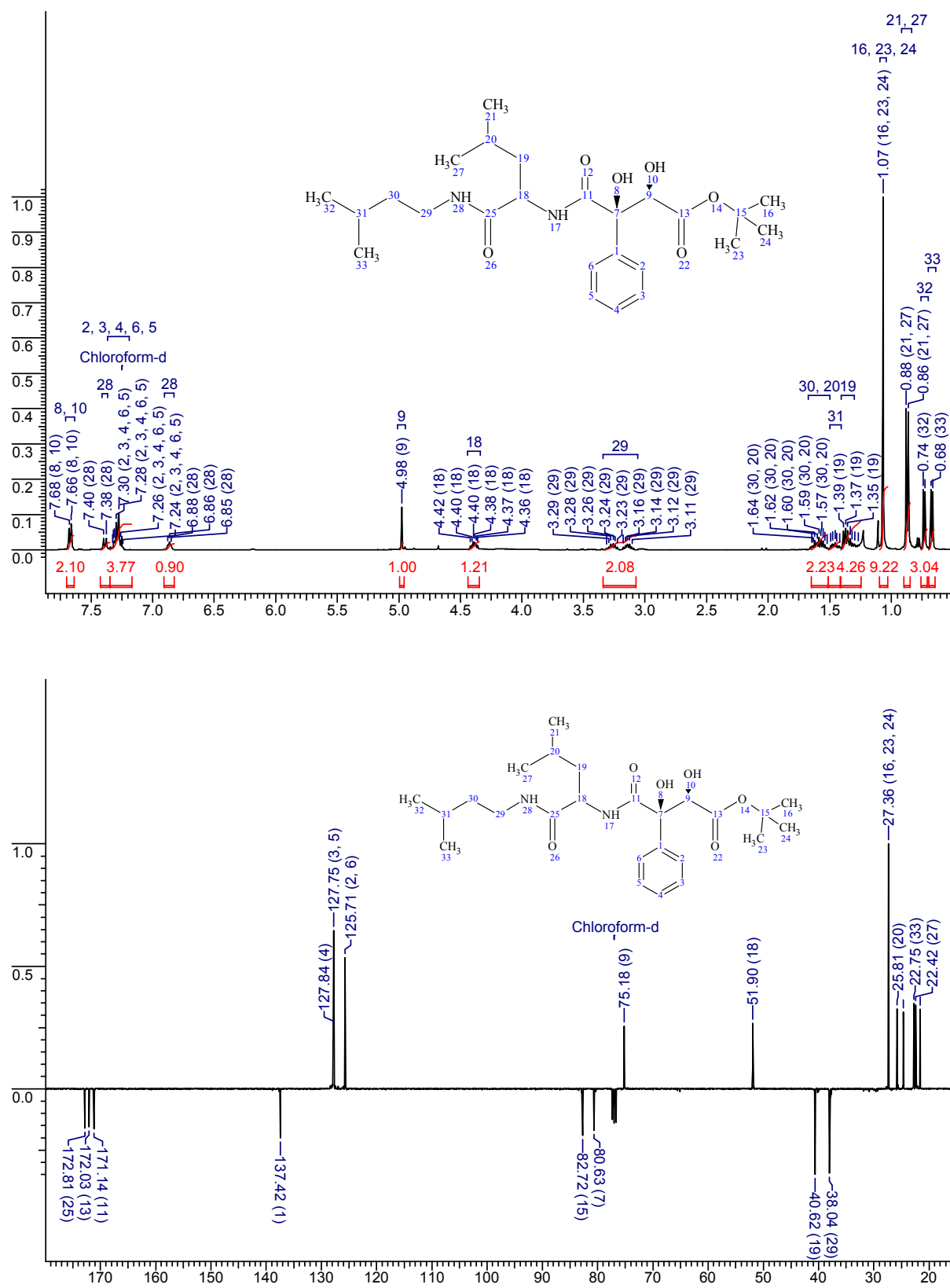
6.6.10 ^1H - und ^{13}C -NMR: E64c-like-(E)-Alken-Ala-OtBu (528)



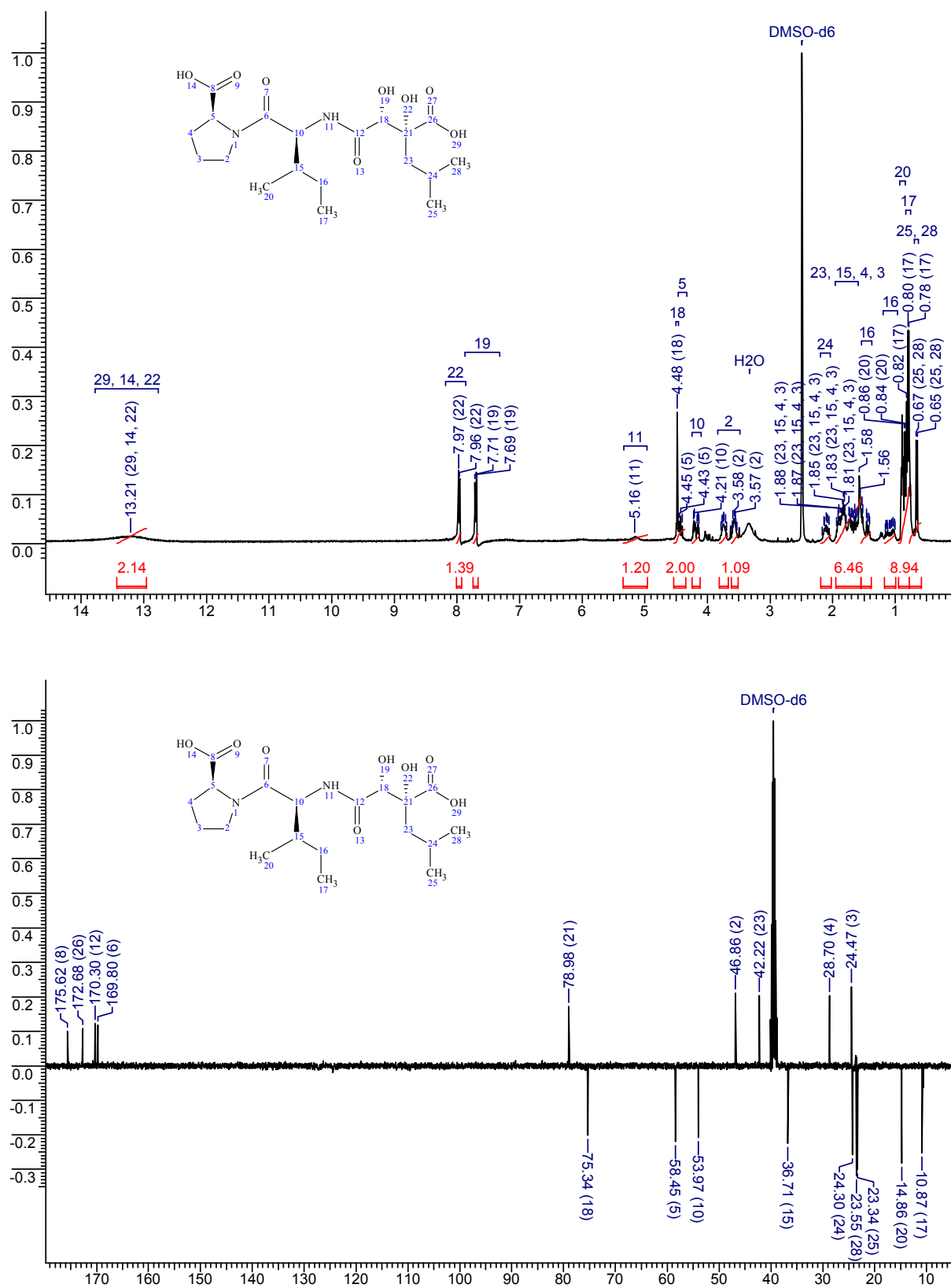
6.6.11 ^1H -, und ^{13}C -NMR: E64c-like-(E)-Alken-Ala-OH (535)

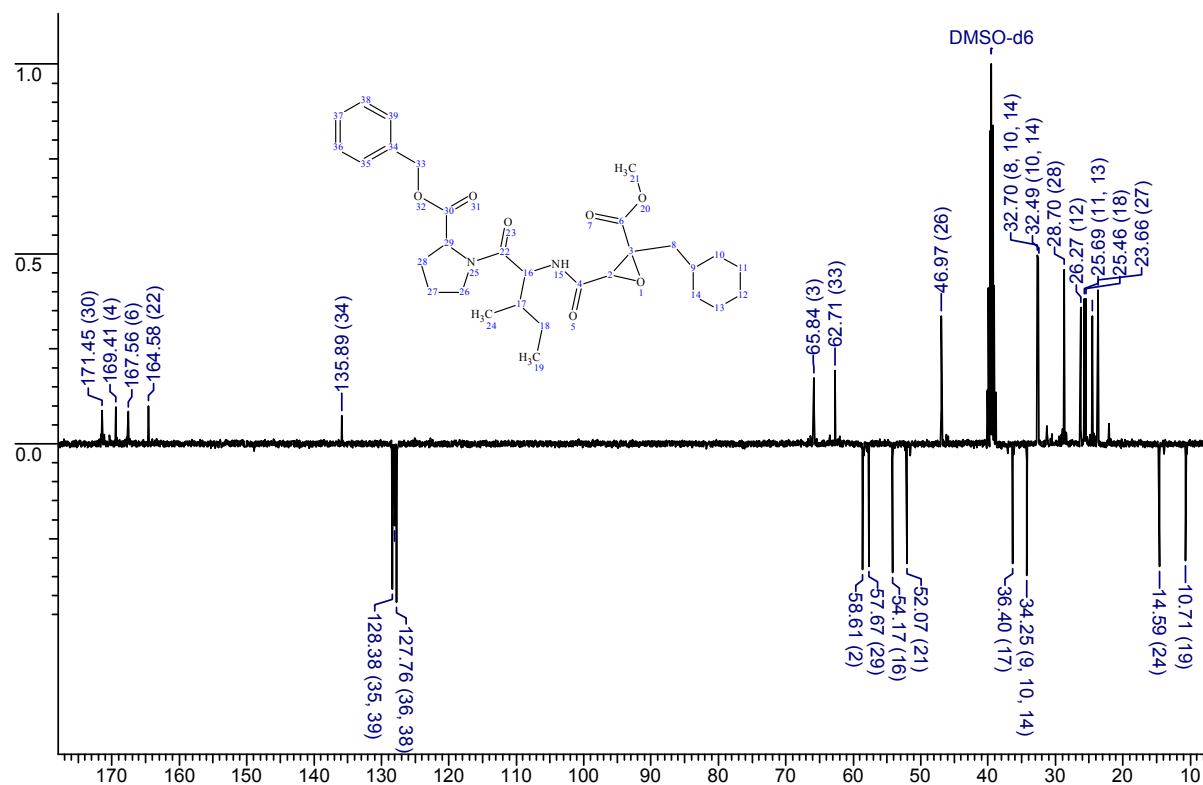
6.6.12 ^1H - und ^{13}C -NMR: CA028-like-(E)-Alken-Ala-OMe (543)

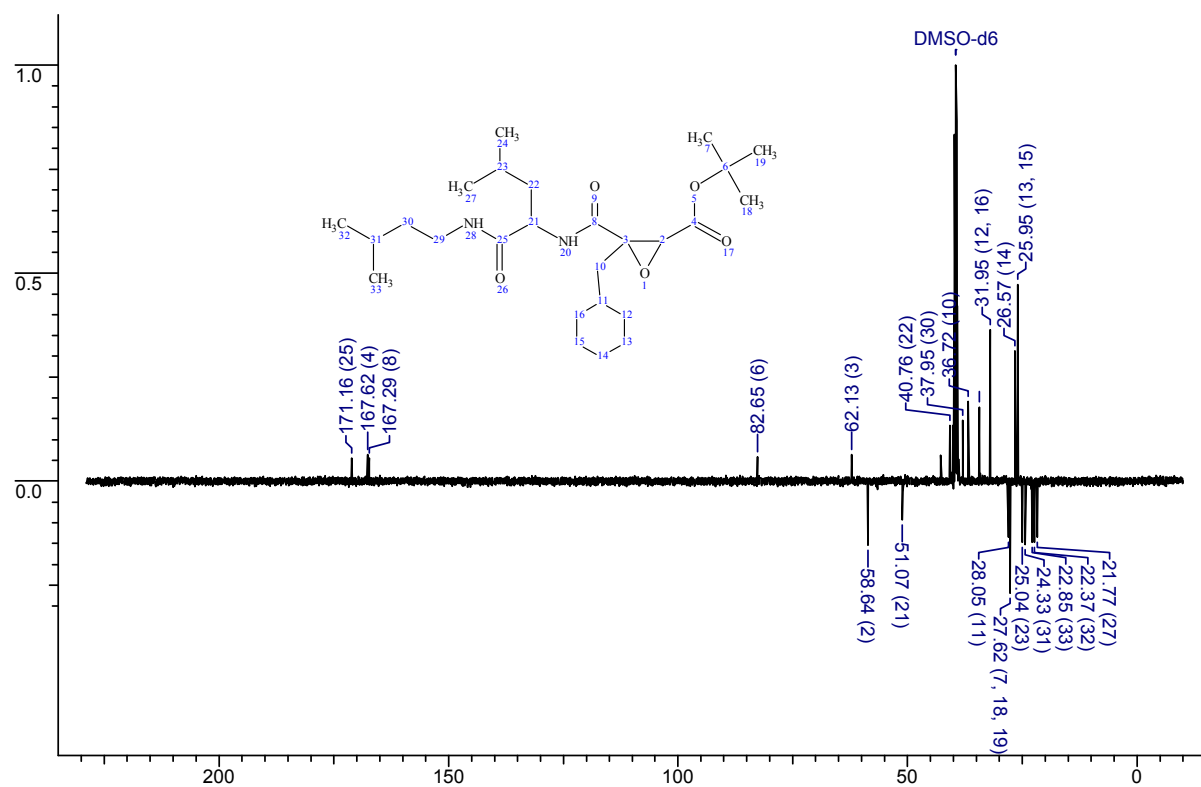
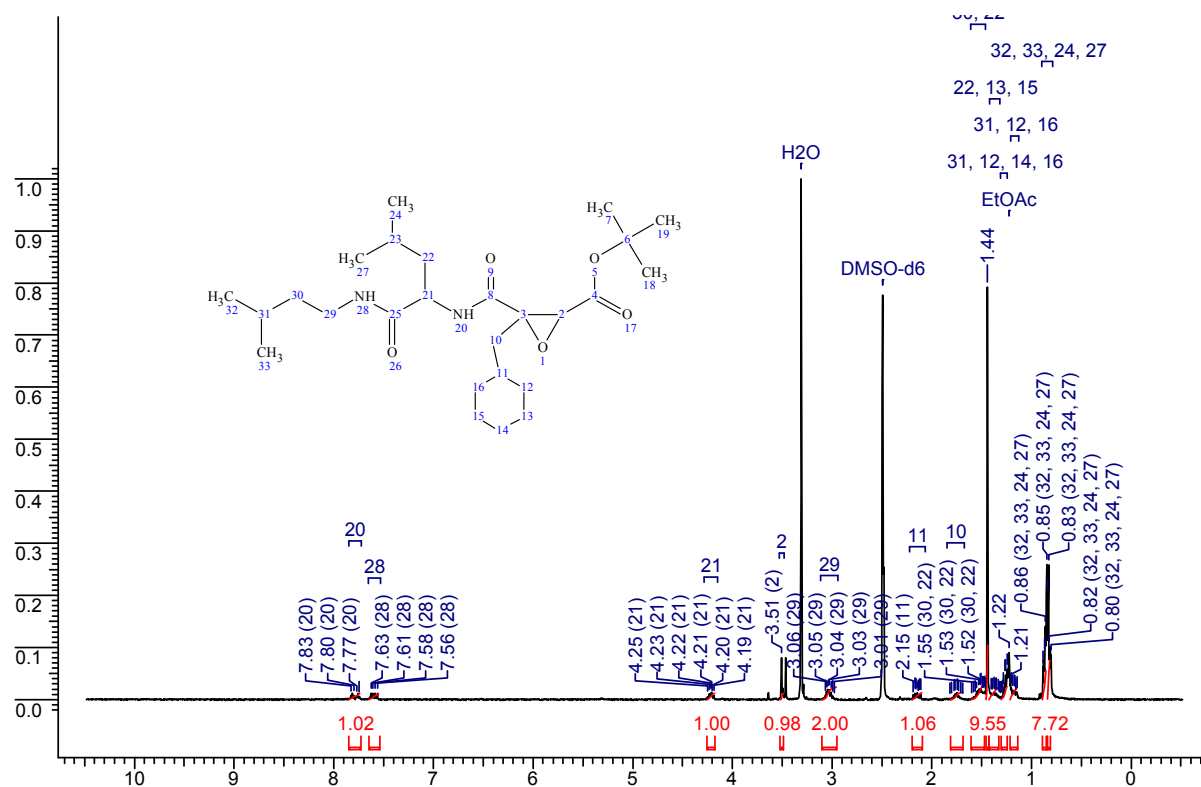
6.6.13 ^1H - und ^{13}C -NMR: CA028-like-(E)-Alken-Leu-OH (552)

6.6.14 ^1H - und ^{13}C -NMR: E64c-like-(S,S)-Diol-Phg-OtBu (560)



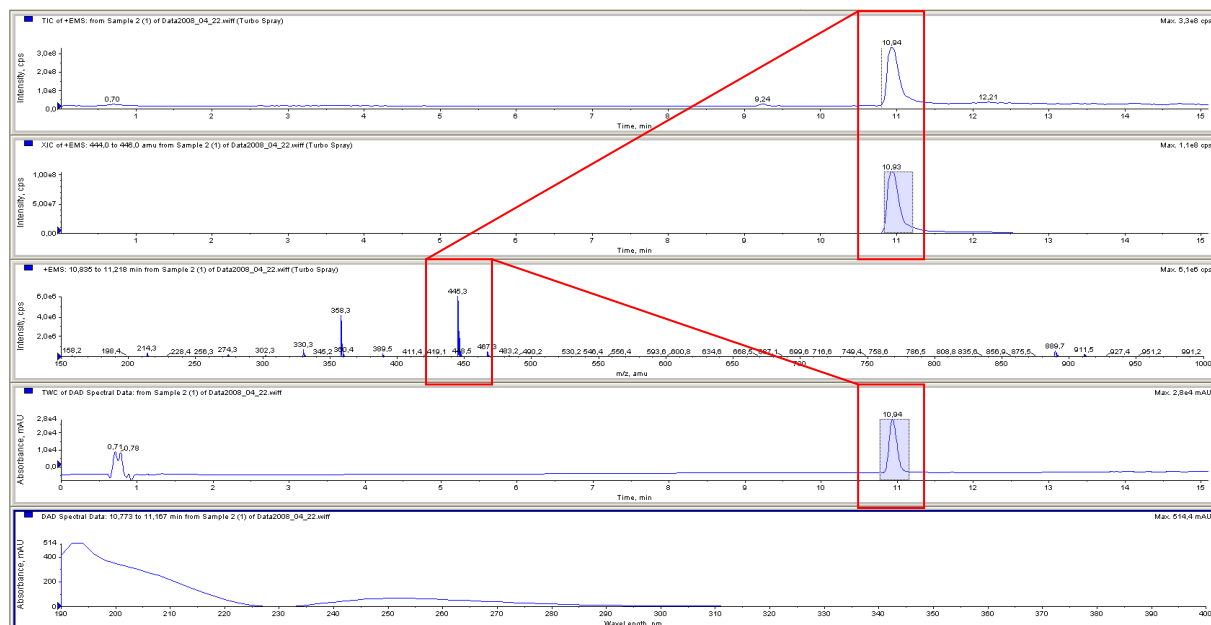
6.6.16 ^1H - und ^{13}C -NMR: CA028-like-(S,S)-Diol-Leu-OH (583)



6.6.18 ^1H - und ^{13}C -NMR: E64c-like-(rac)-Epoxy-Cha-OtBu (595)

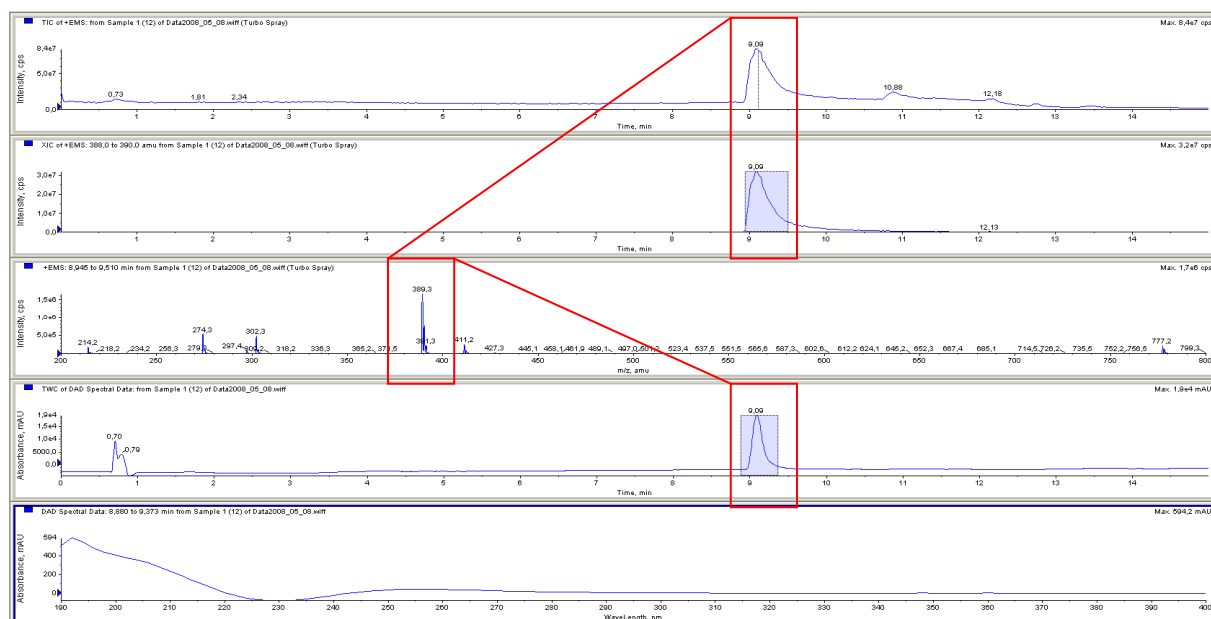
6.7 HPLC-ESI-MS-Analytik ausgewählter *E64c-like*- und *CA028-like*-Tripeptidinhibitoren

6.7.1 HPLC-ESI-MS: *E64c-like*-(*E*)-Alken-Phe-OtBu (**531**)



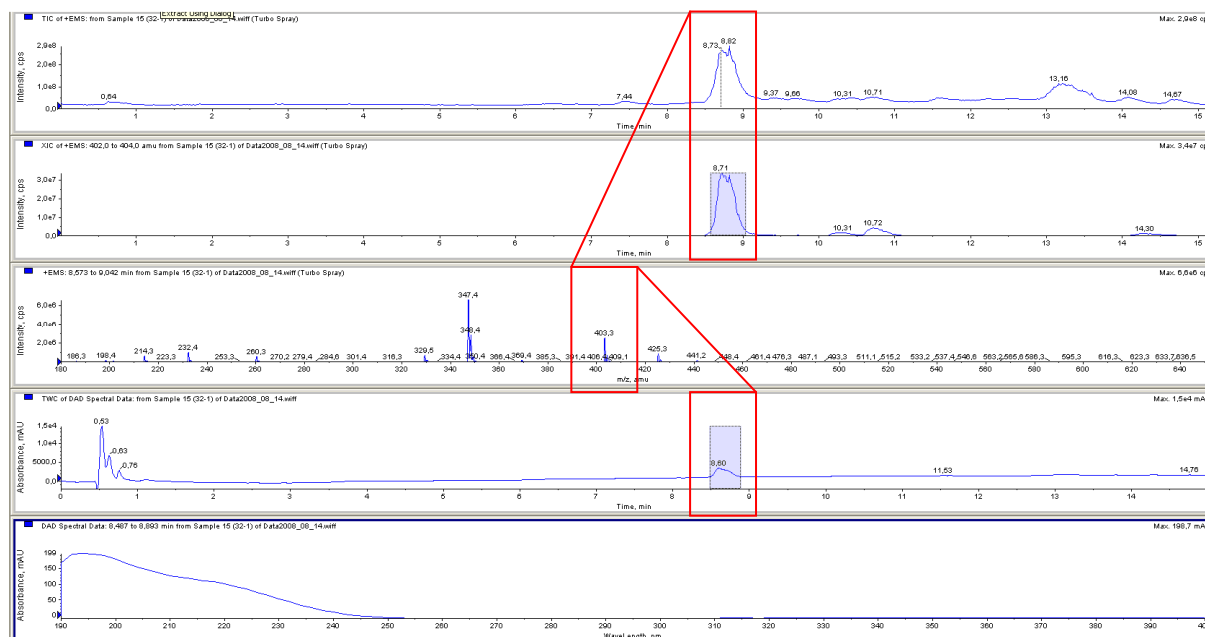
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatoraphischer Reinigung von *E64c-like*-(*E*)-Alken-Phe-OtBu (**531**); $[M+H]^+ = 445.3$.

6.7.2 HPLC-ESI-MS: *E64c-like*-(*E*)-Alken-Phe-OH (**538**)



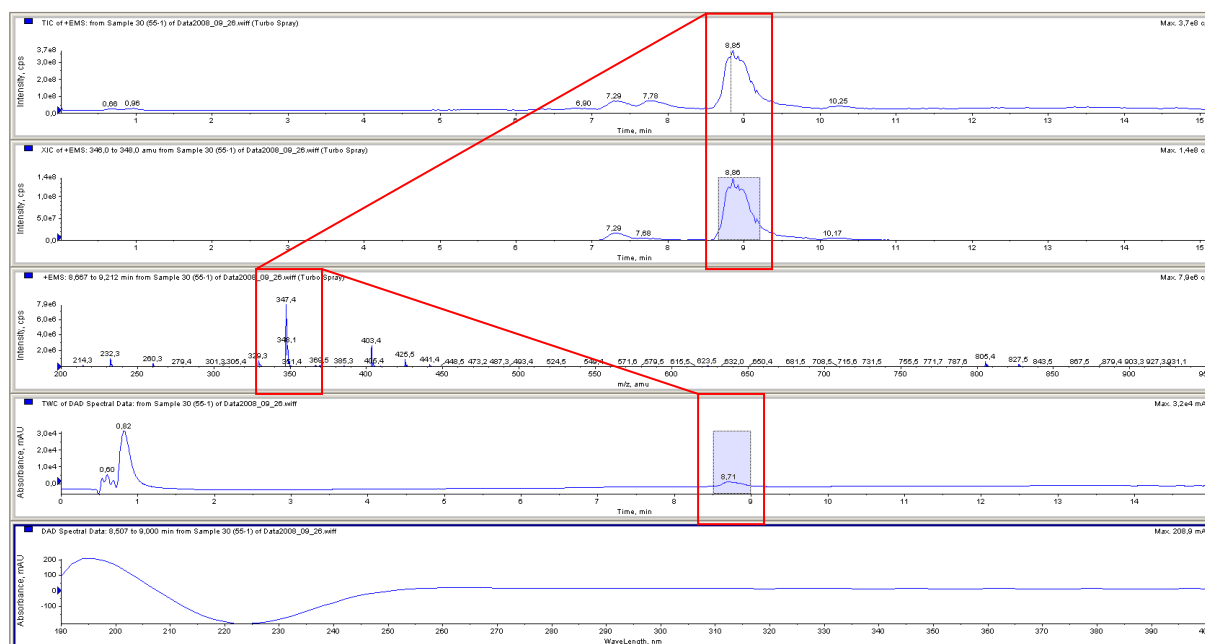
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatoraphischer Reinigung von *E64c-like*-(*E*)-Alken-Phe-OH (**538**); $[M+H]^+ = 389.3$.

6.7.3 HPLC-ESI-MS: *E64c-like-(S,S)-Diol-Ala-OtBu* (558)



HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatoraphischer Reinigung von *E64c-like-(S,S)-Diol-Ala-OtBu* (**558**); $[M+H]^+ = 403.3$.

6.7.4 HPLC-ESI-MS: *E64c-like-(S,S)-Diol-Ala-OH* (566)



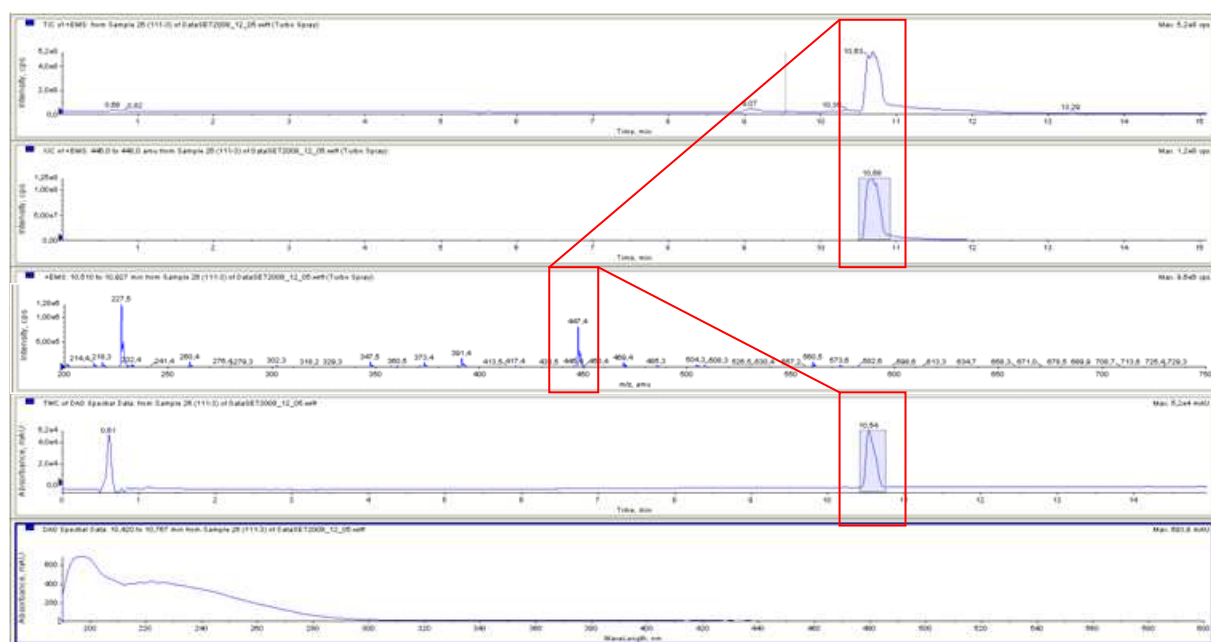
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatoraphischer Reinigung von *E64c-like-(S,S)-Diol-Ala-OH* (**566**); $[M+H]^+ = 347.4$.

6.7.5 HPLC-ESI-MS: *E64c-like-(S,S)-Epoxy-Ala-OtBu* (**590**)



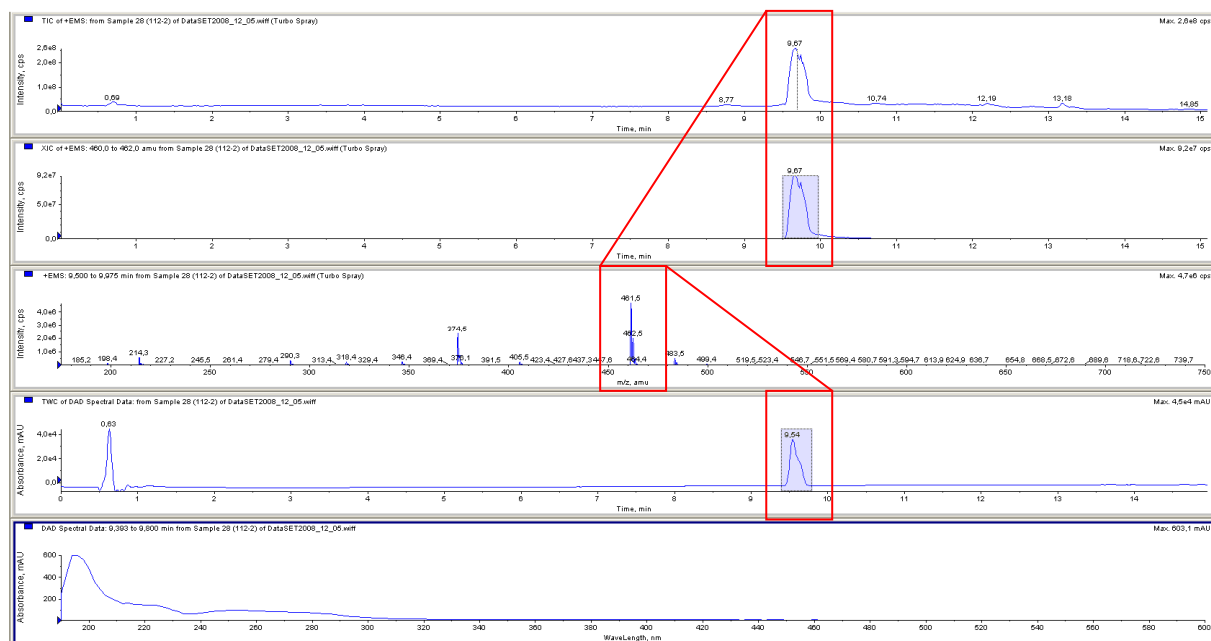
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatoraphischer Reinigung von *E64c-like-(S,S)-Epoxy-Ala-OtBu* (**590**); $[M+H]^+ = 385.4$.

6.7.6 HPLC-ESI-MS: *E64c-like-(S,S)-Epoxy-Phg-OtBu* (**592**)



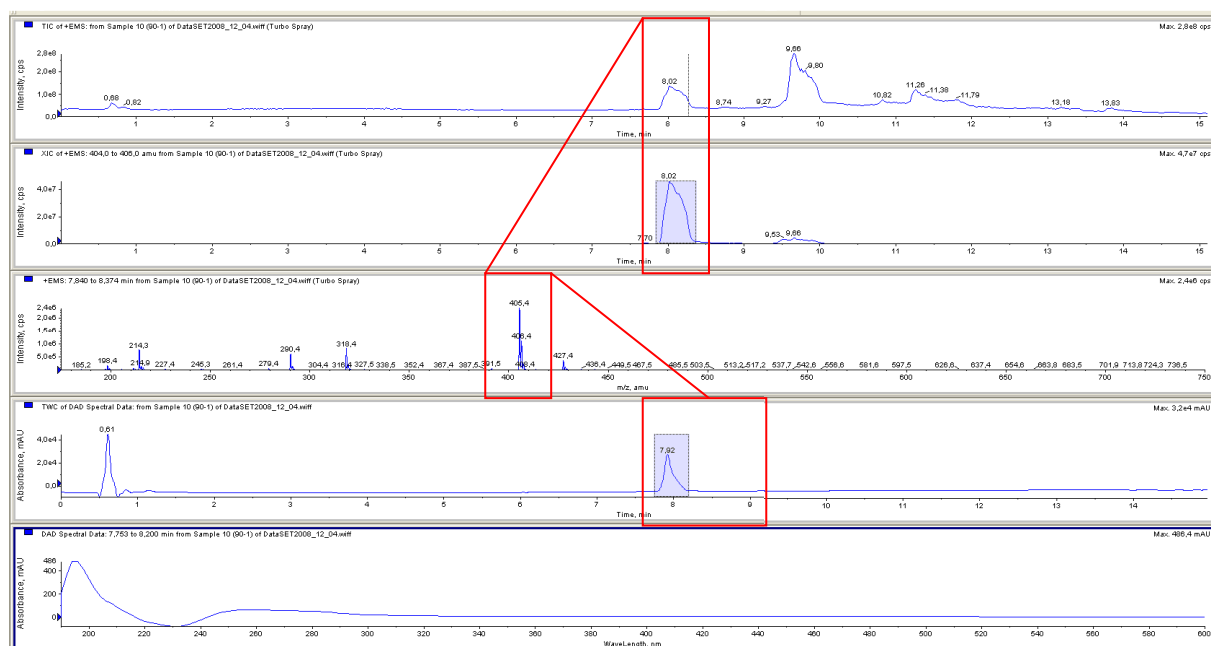
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatoraphischer Reinigung von *E64c-like-(S,S)-Epoxy-Phg-OtBu* (**592**); $[M+H]^+ = 447.5$.

6.7.7 HPLC-ESI-MS: *E64c-like-(S,S)-Epoxy-Phe-OtBu* (593)



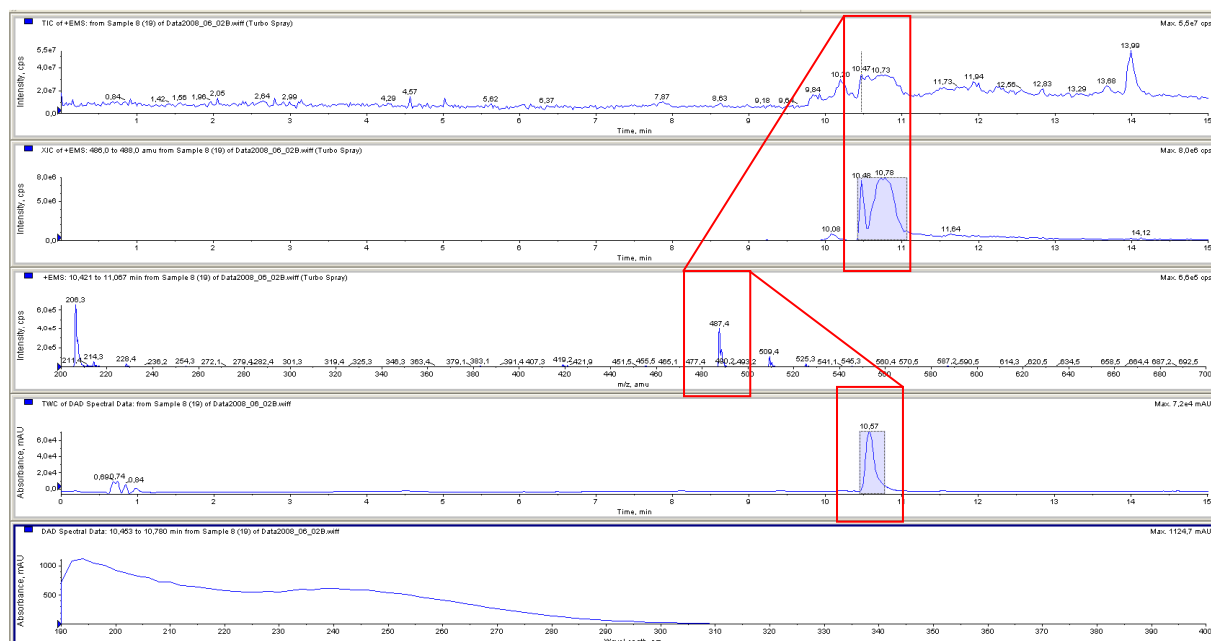
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatoraphischer Reinigung von *E64c-like-(S,S)-Epoxy-Phe-OtBu* (**593**); $[M+H]^+ = 461.5$.

6.7.8 HPLC-ESI-MS: *E64c-like-(S,S)-Epoxy-Phe-OH* (611)



HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatoraphischer Reinigung von *E64c-like-(S,S)-Epoxy-Phe-OH* (**611**); $[M+H]^+ = 405.4$.

6.7.9 HPLC-ESI-MS: CA028-like-(E)-Alken-Leu-OMe (544)



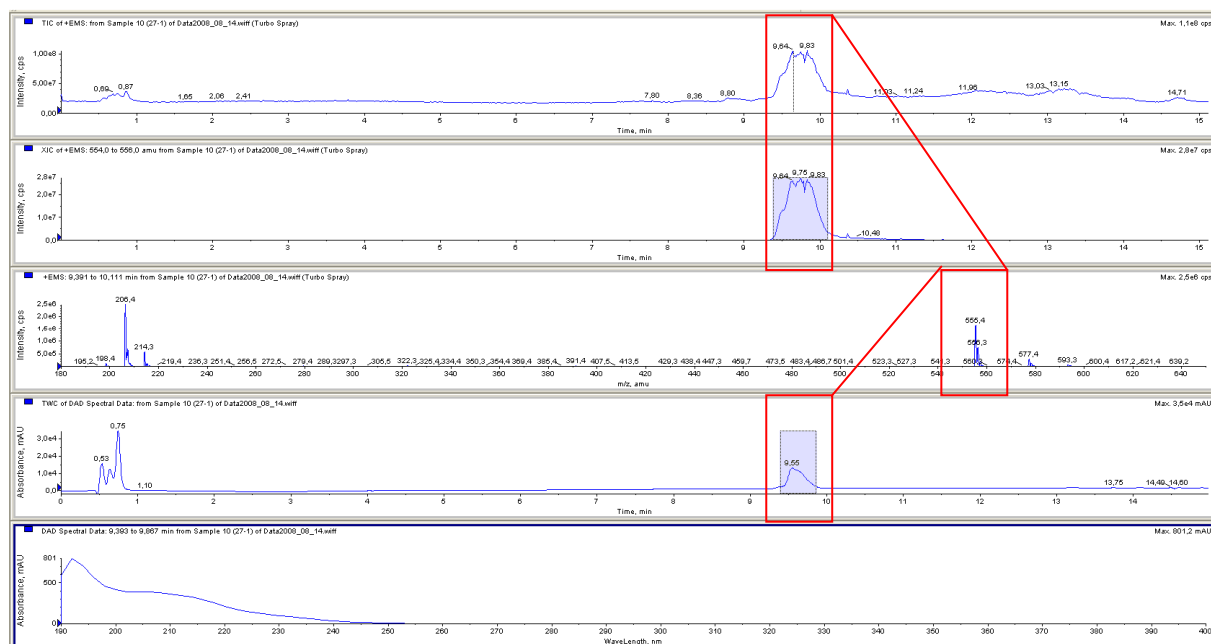
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von CA028-like-(E)-Alken-Leu-OMe (544); $[M+H]^+ = 487.4$.

6.7.10 HPLC-ESI-MS: CA028-like-(E)-Alken-Leu-OH (552)



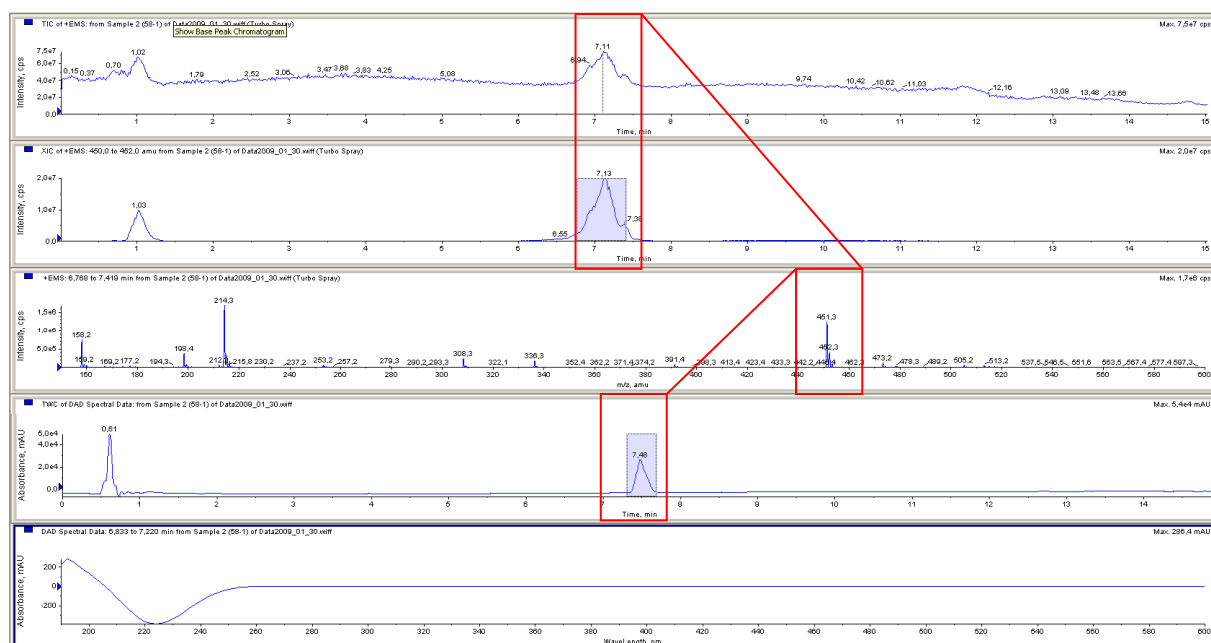
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von CA028-like-(E)-Alken-Leu-OH (552); $[M+H]^+ = 383.5$.

6.7.11 HPLC-ESI-MS: CA028-like-(S,S)-Diol-Phe-OMe (577)



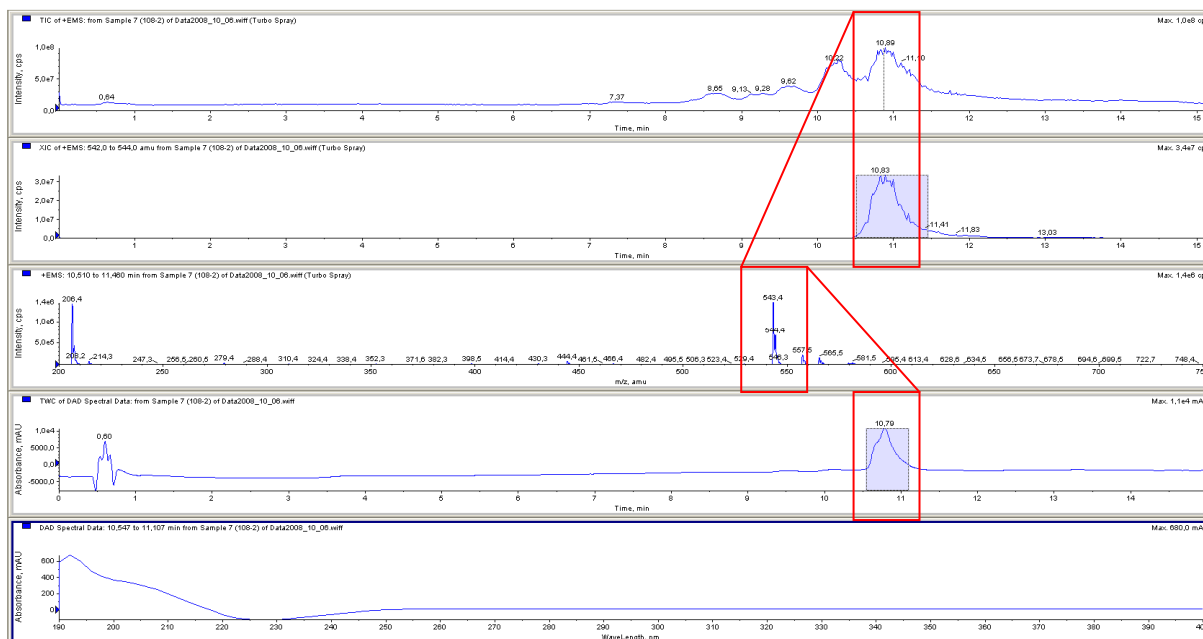
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von CA028-like-(S,S)-Diol-Phe-OMe (**577**); $[M+H]^+ = 555.4$.

6.7.12 HPLC-ESI-MS: CA028-like-(S,S)-Diol-Phe-OH (585)



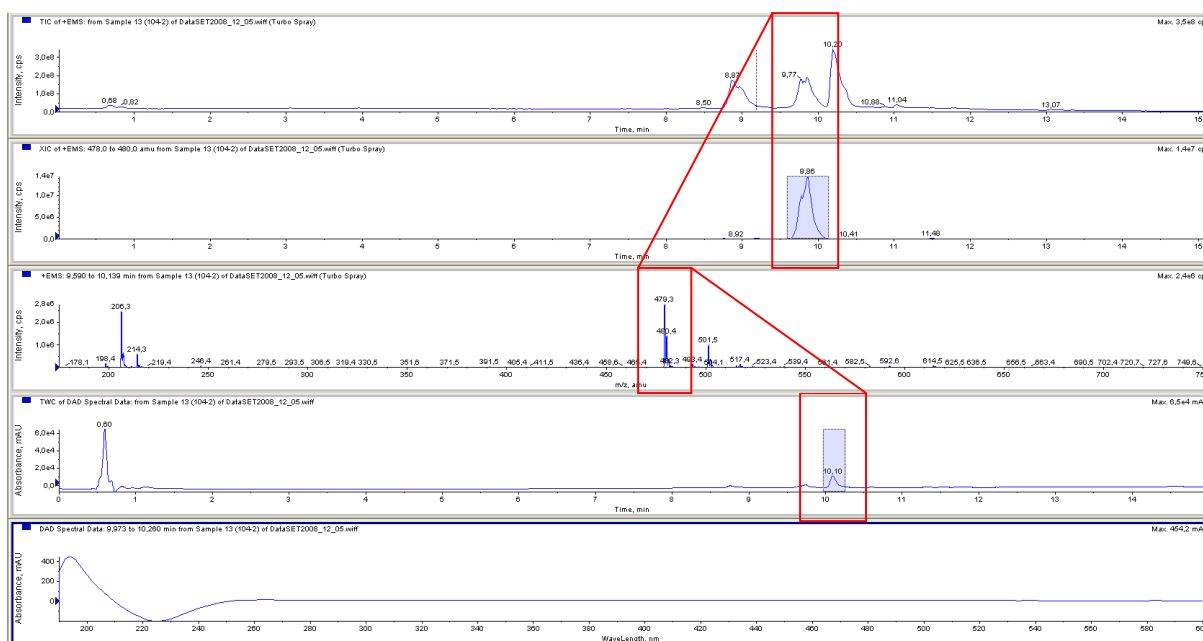
HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von CA028-like-(S,S)-Diol-Phe-OH (**585**); $[M+H]^+ = 451.3$.

6.7.13 HPLC-ESI-MS: CA028-like-(R,R)-Epoxy-Cha-OMe (605)



HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von CA028-like-(R,R)-Epoxy-Cha-OMe (**605**); $[M+H]^+ = 543.4$.

6.7.14 HPLC-ESI-MS: CA028-like-(rac)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OMe (603)



HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von CA028-like-(rac)-Epoxy- β -Fluor-Ala-OMe (**603**); $[M+H]^+ = 479.5$

6.7.15 HPLC-ESI-MS: CA028-like-(R,R)-Epoxy-Phe-OMe (602)



HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von CA028-like-(R,R)-Epoxy-Phe-OMe (**602**); $[M+H]^+ = 537.4$.

6.7.16 HPLC-ESI-MS: CA028-like-(R,R)-Epoxy-Phe-OH (612)

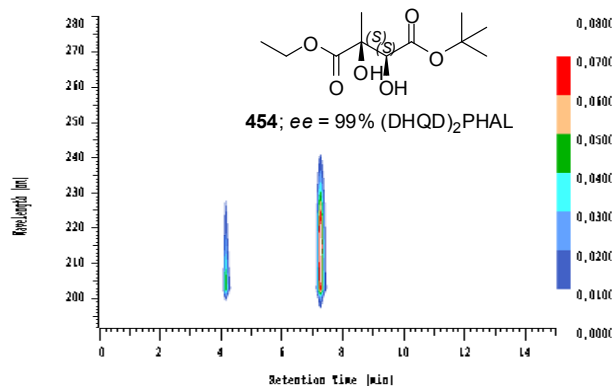
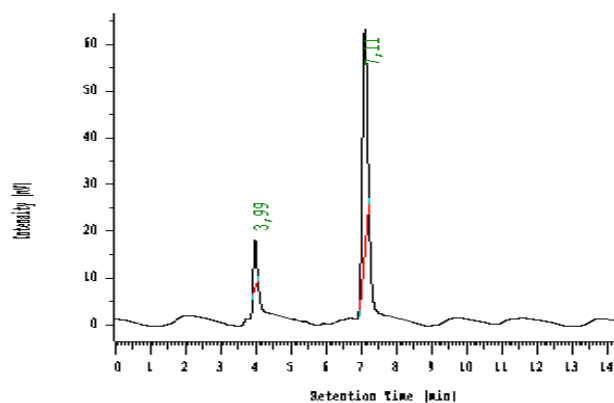


HPLC-ESI-MS-Chromatogramm nach säulenchromatographischer Reinigung von CA028-like-(R,R)-Epoxy-Phe-OH (**612**); $[M+H]^+ = 433.3$.

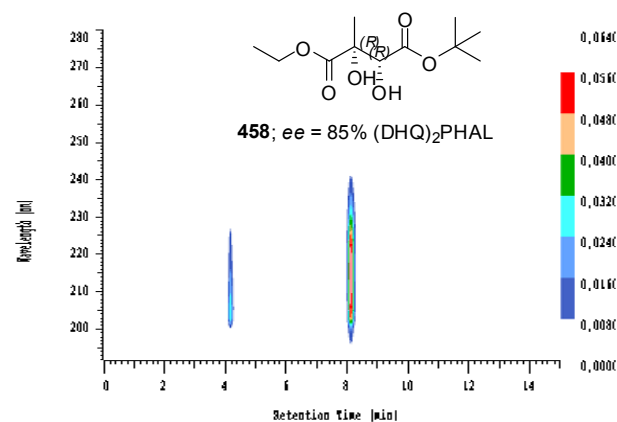
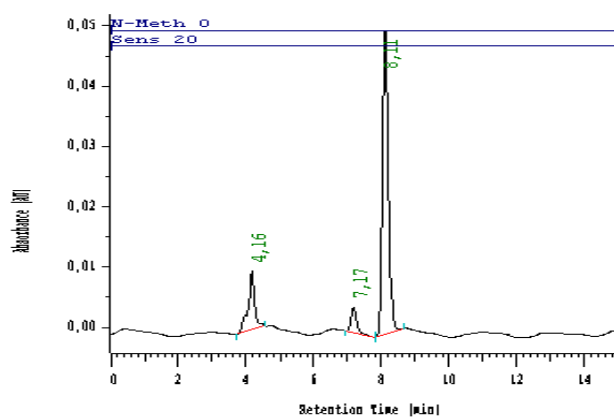
6.8 Chirale-HPLC-Analytik von enantiomerenreinen (S,S)- und (R,R)-Diolen bzw. -Epoxiden

6.8.1 Chiral-AD-H: (R,R)- und (S,S)-Diol-Ala [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]

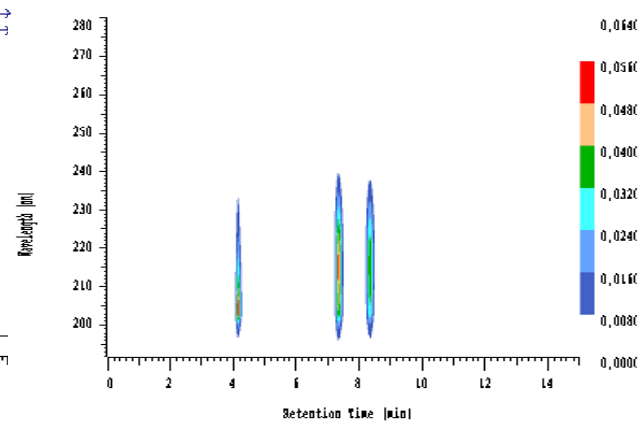
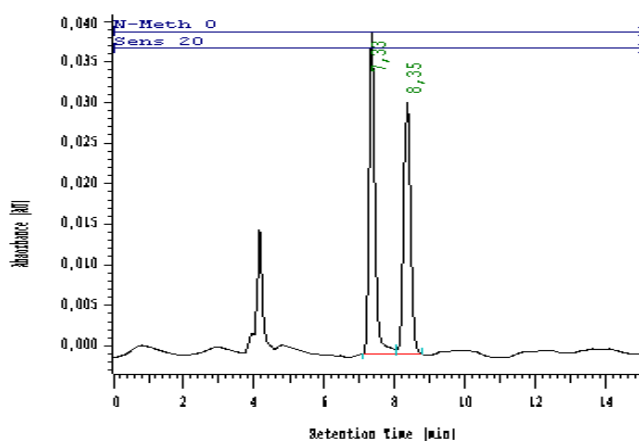
(S,S)-Diol-Ala (**454**)

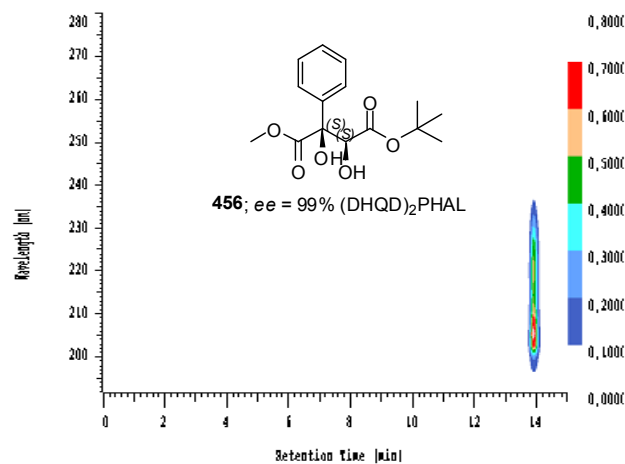
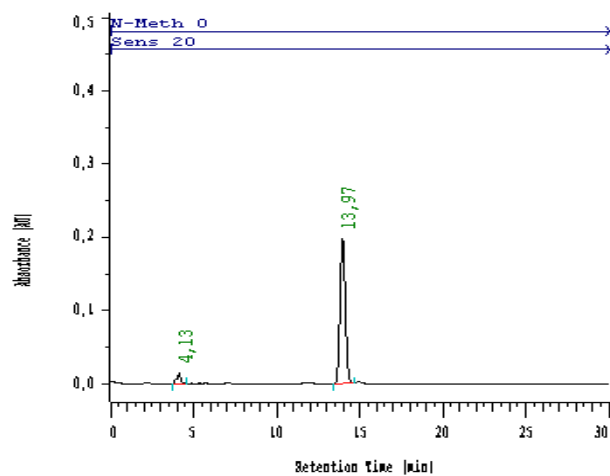
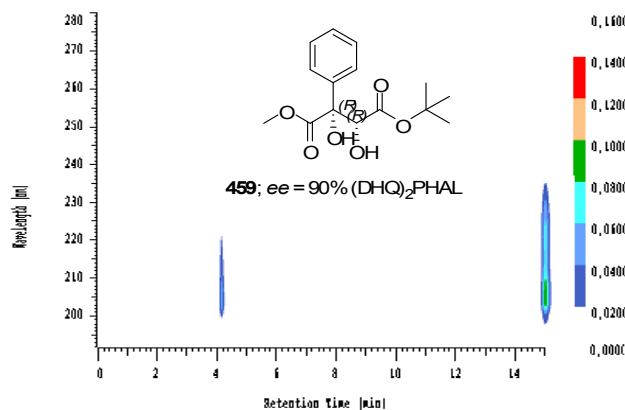
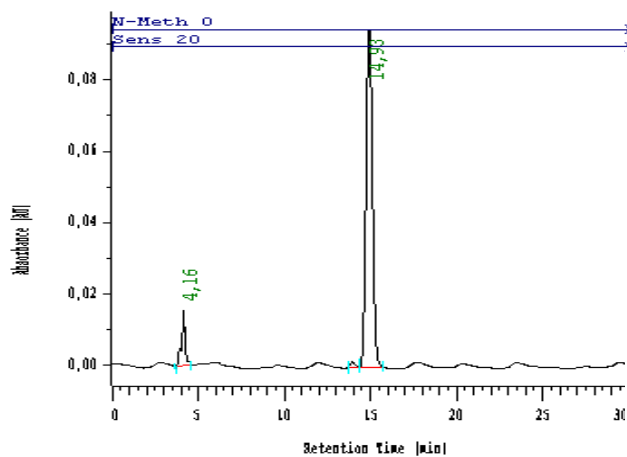
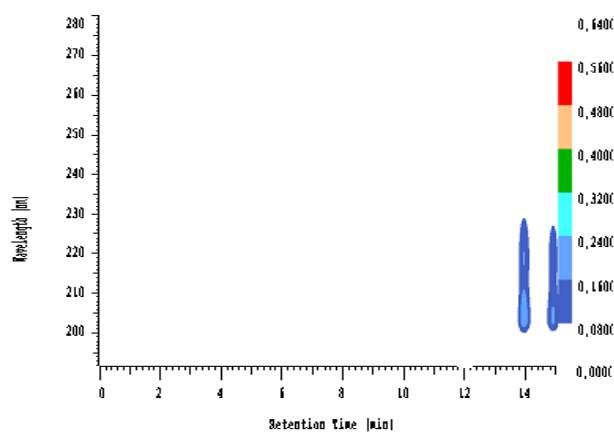
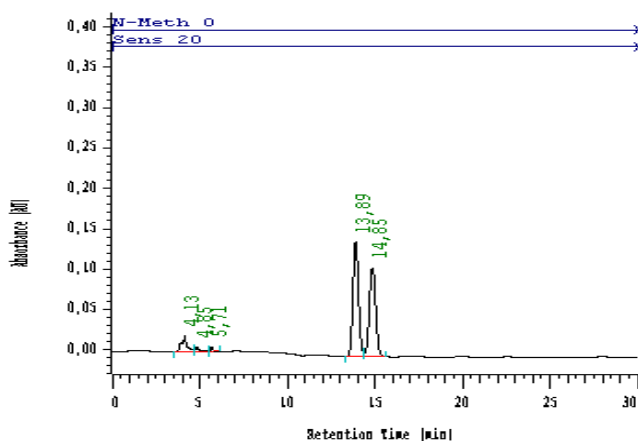


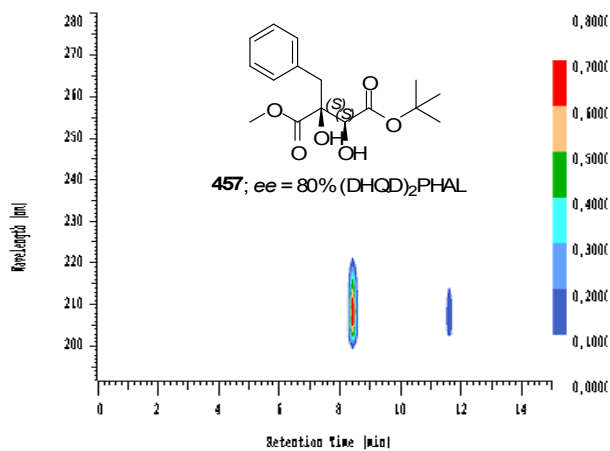
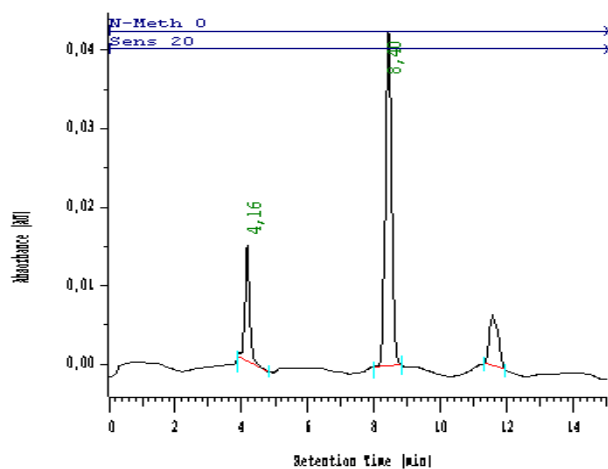
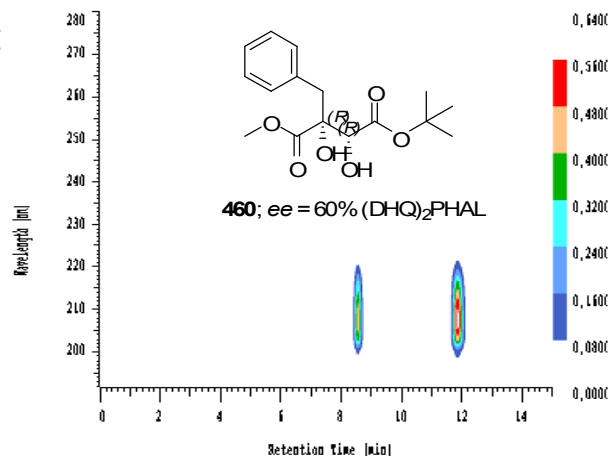
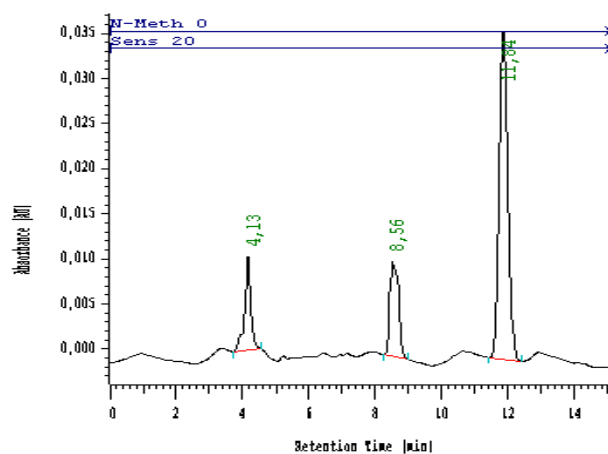
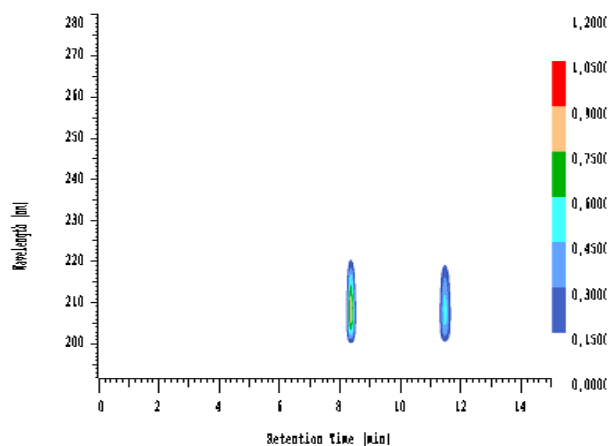
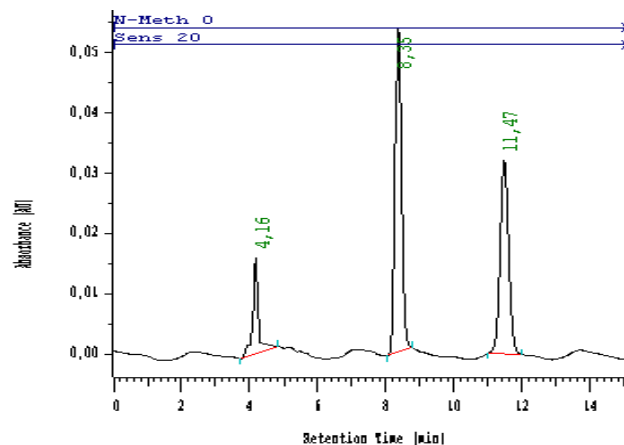
(R,R)-Diol-Ala (**458**)



Racemat-Diol-Ala

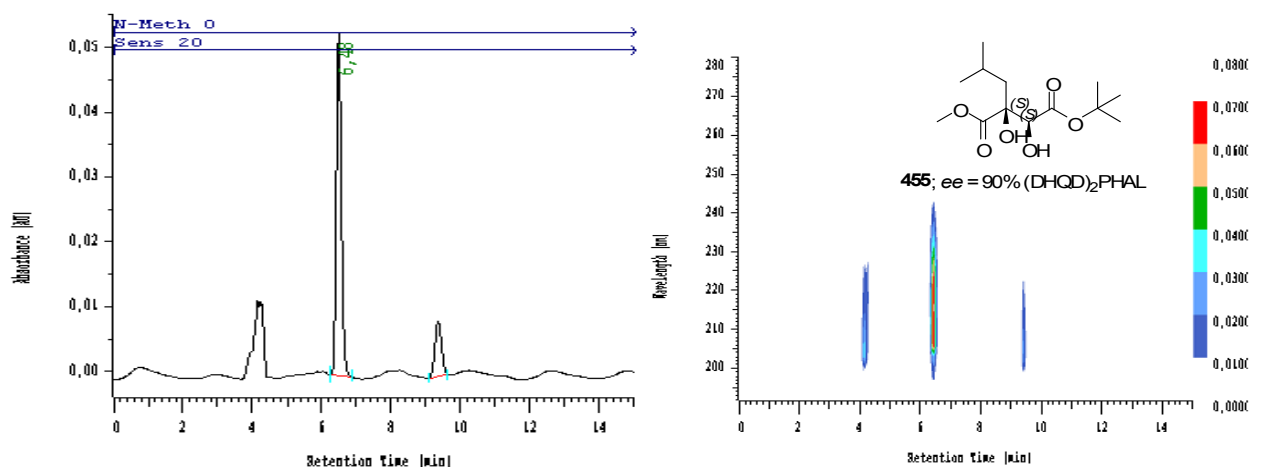


6.8.2 Chiral-AD-H: (R,R)- und (S,S)-Diol-Phg [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]**(S,S)-Diol-Phg (456)****(R,R)-Diol-Phg (459)****Racemat-Diol-Phg**

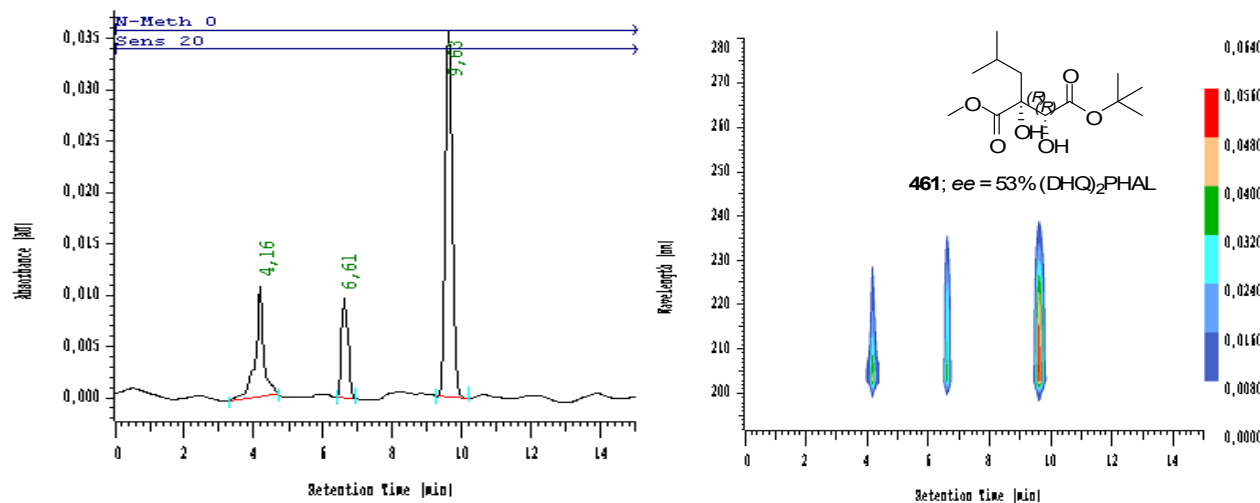
6.8.3 Chiral-AD-H: (R,R)- und (S,S)-Diol-Phe [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]**(S,S)-Diol-Phe (457)****(R,R)-Diol-Phe (460)****Racemat-Diol-Phe**

6.8.4 Chiral-AD-H: (*R,R*)- und (*S,S*)-Diol-Leu [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]

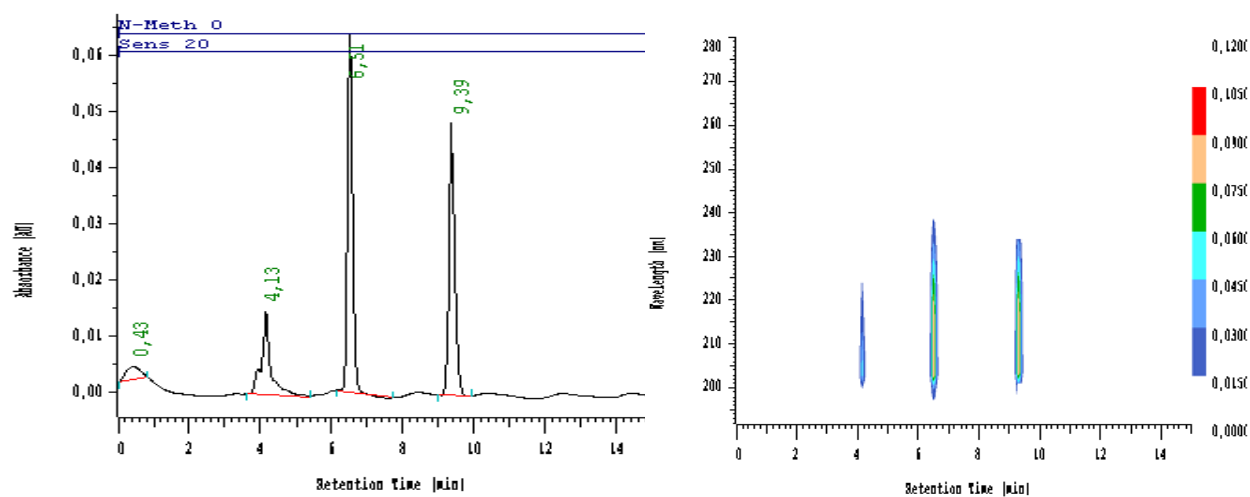
(*S,S*)-Diol-Leu (455)



(*R,R*)-Diol-Leu (461)

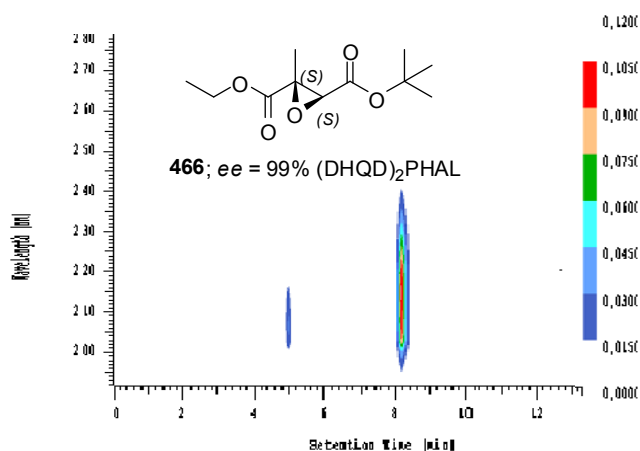
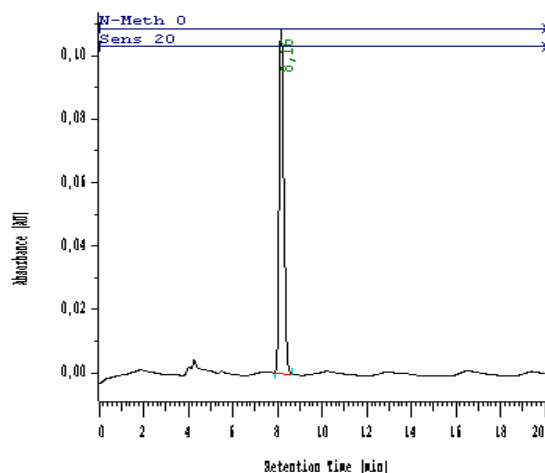


Racemat-Diol-Leu

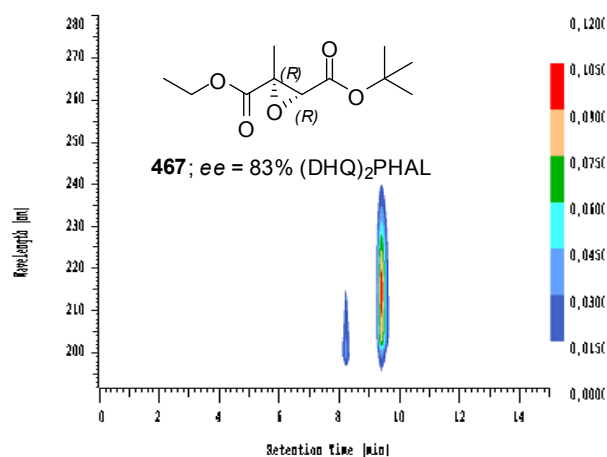
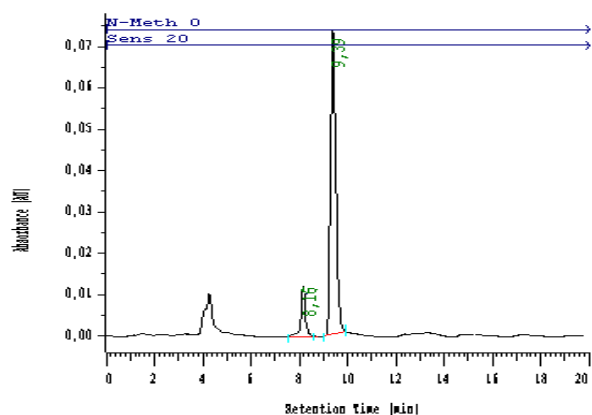


6.8.5 Chiral-AD-H: (*R,R*)- und (*S,S*)-Epoxy-Ala [*iso*-PrOH/*n*-Hexan; 50:50]

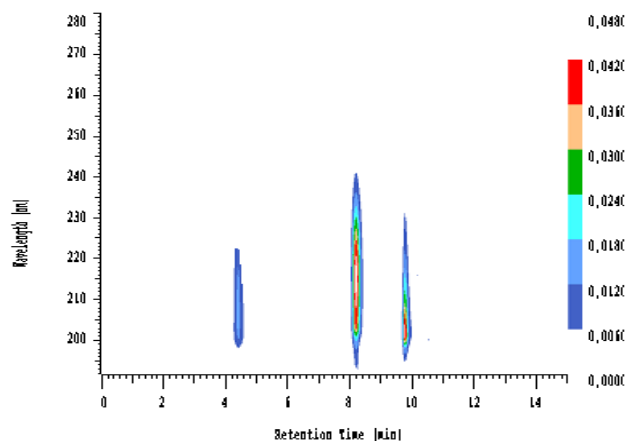
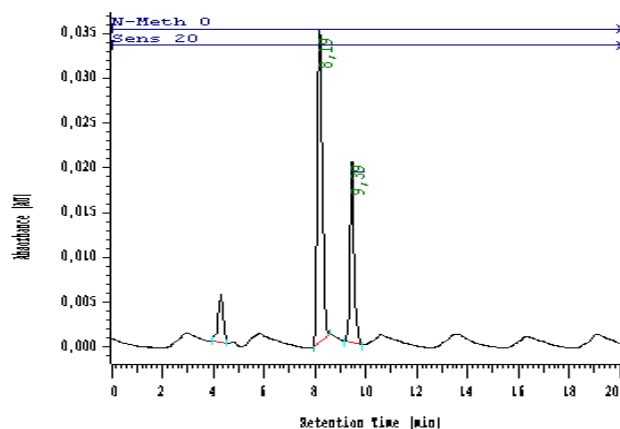
(*S,S*)-Epoxy-Ala (466)

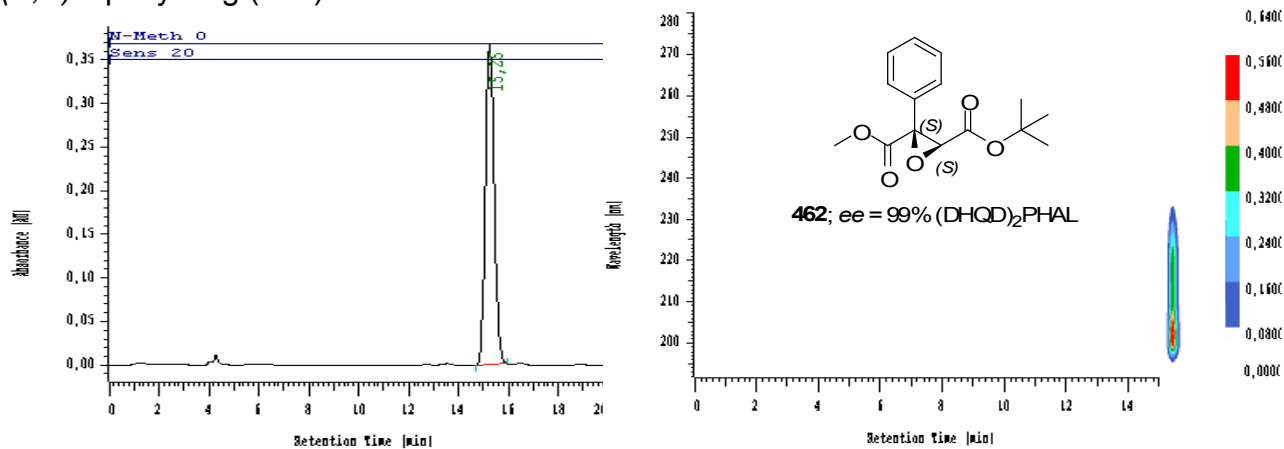
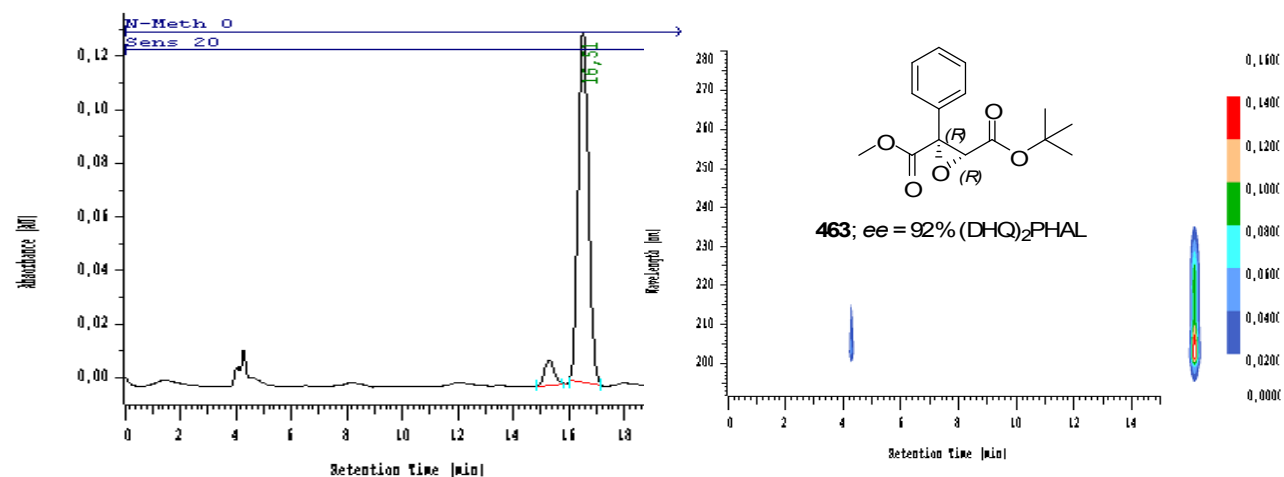
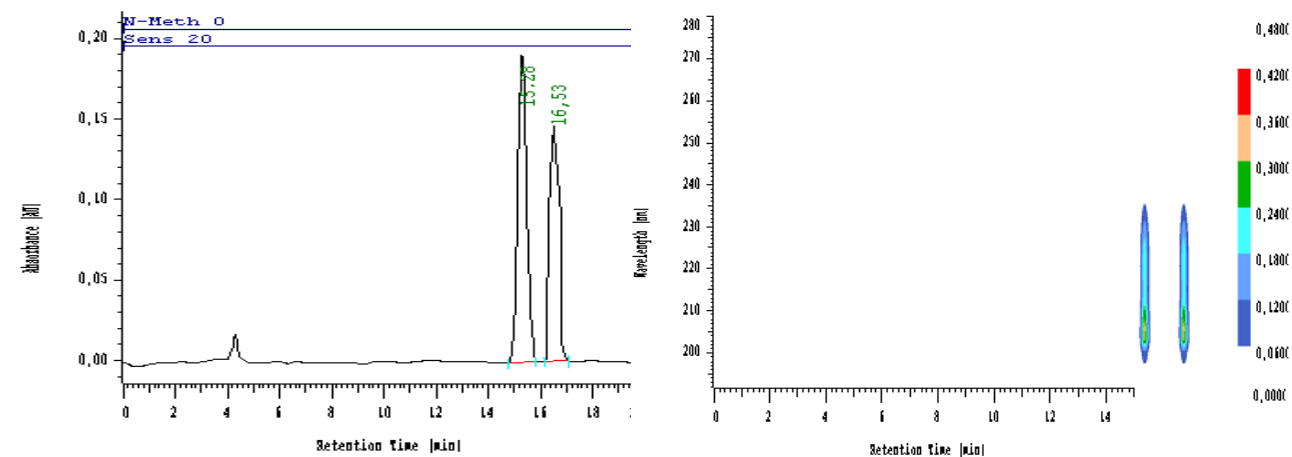


(*R,R*)-Epoxy-Ala (467)



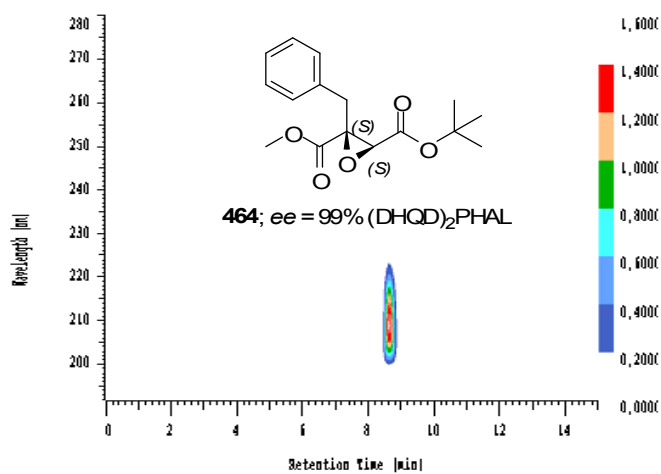
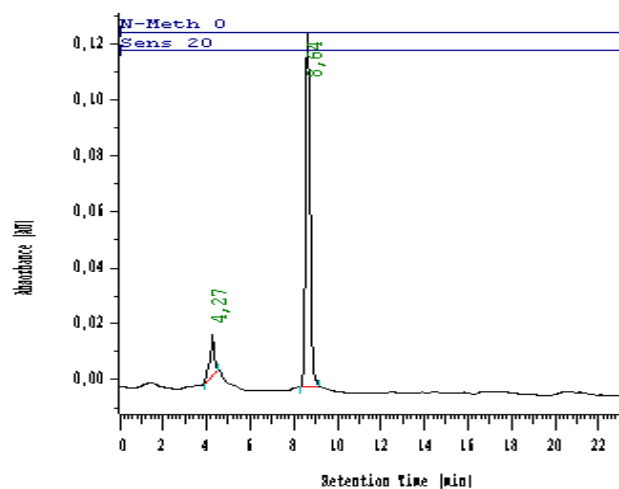
Racemat-Epoxy-Ala



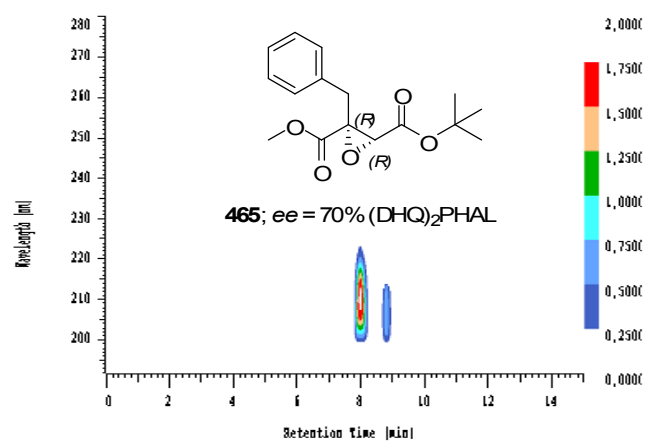
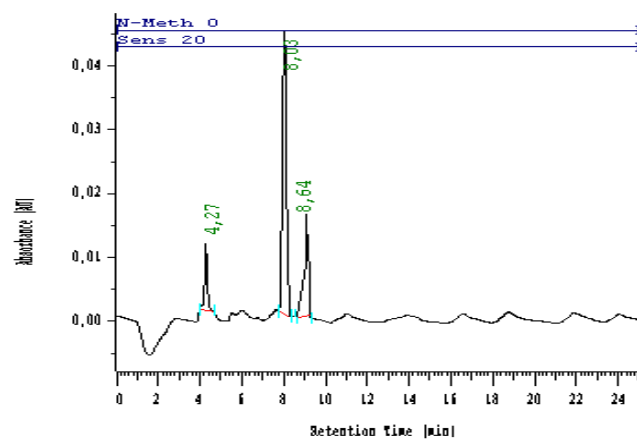
6.8.6 Chiral-AD-H: (R,R)- und (S,S)-Epoxy-Phg [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]**(S,S)-Epoxy-Phg (462)****(R,R)-Epoxy-Phg (463)****Racemat-Epoxy-Phg**

6.8.7 Chiral-AD-H: (R,R)- und (S,S)-Epoxy-Phe [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]

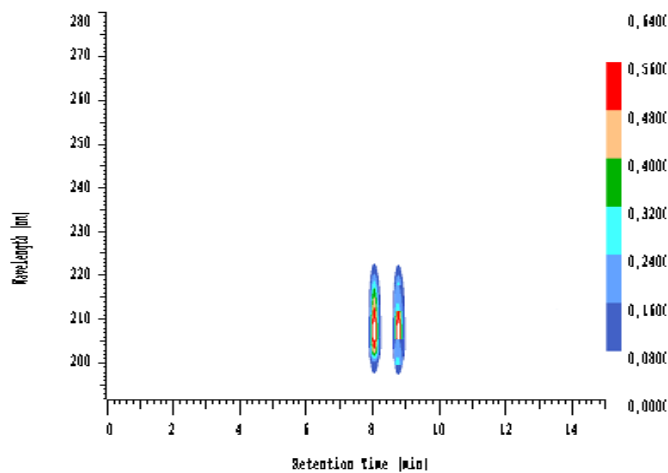
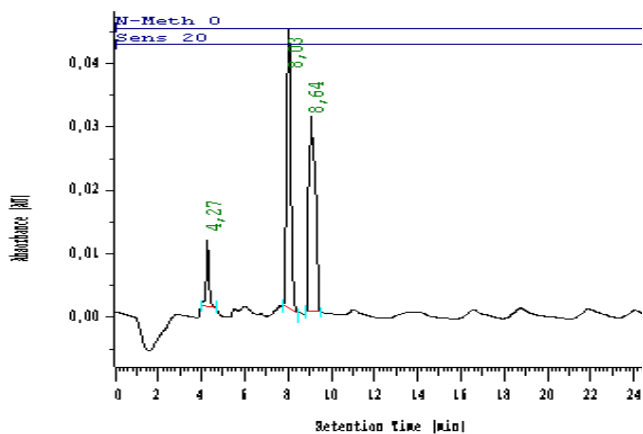
(S,S)-Epoxy-Phe (464)



(R,R)-Epoxy-Phe (465)

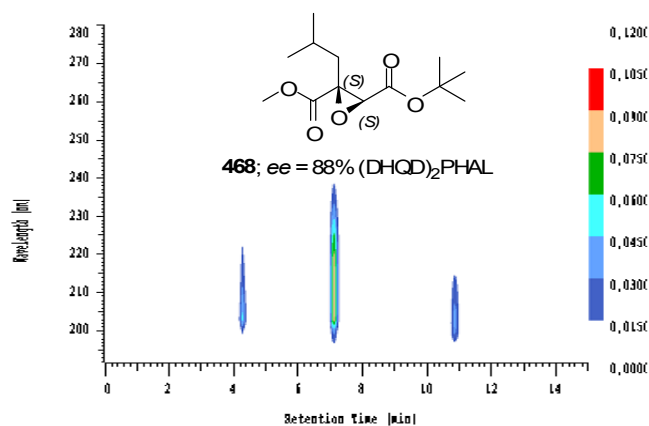
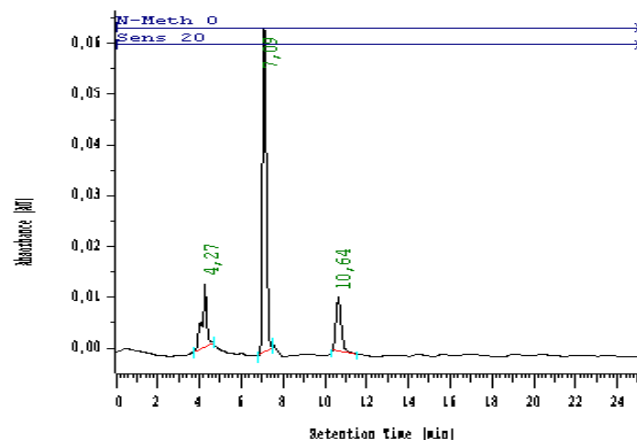


Racemat-Epoxy-Phe

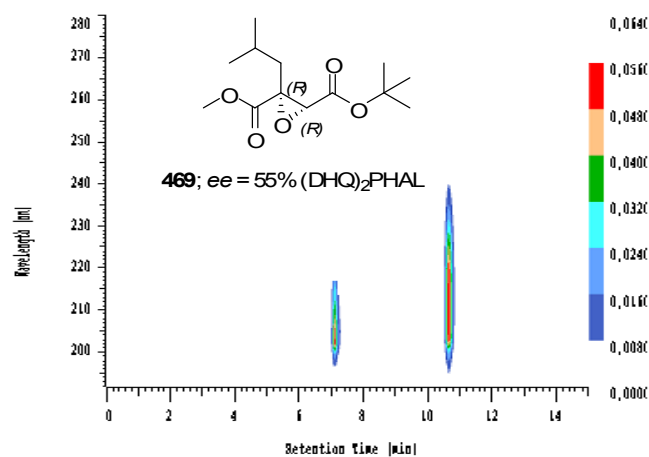
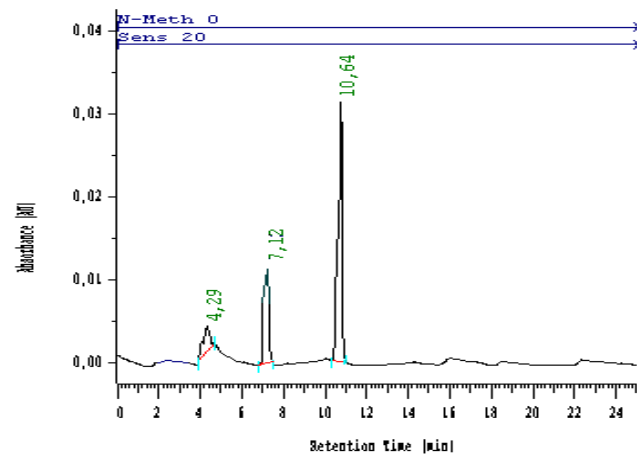


6.8.8 Chiral-AD-H: (*R,R*)- und (*S,S*)- Epoxy-Leu [iso-PrOH/n-Hexan; 50:50]

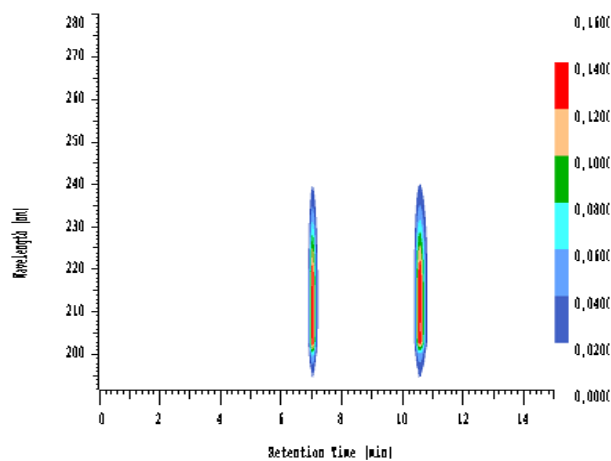
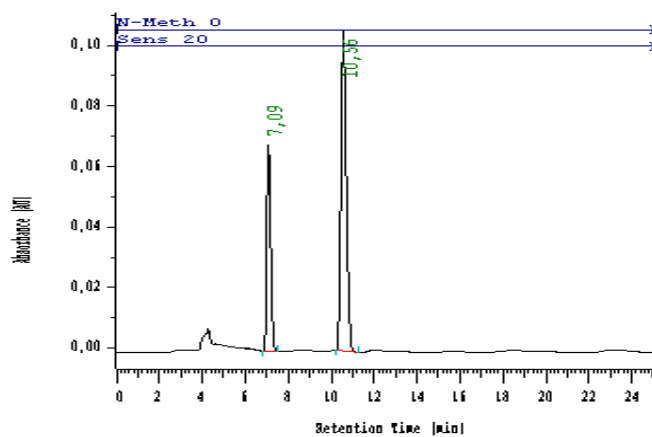
(*S,S*)-Epoxy-Leu (468)



(*R,R*)-Epoxy-Leu (469)



Racemat-Epoxy-Leu



7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolutiert
ACAT	Acyl-CoA Cholesterin Acyltransferase
ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzym</i>
AD	asymmetrische Dihydroxylierung
AdoMet	<i>S-Adenosyl-L-methionin</i>
Ala	Alanin
Alloc	Allyloxycarbonyl
AMP	antimikrobielles Peptid
APT	<i>attached proton test</i>
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATR	<i>attenuated total reflectance</i>
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
<i>t</i> -BuLi	<i>tert</i> -Butyllithium
CatB	Cathepsin B
CatL	Cathepsin L
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CC	<i>cytotoxic concentration</i> ; zytotoxische Konzentration
Cha	Cyclohexylalanin
Chg	Cyclohexylglycin
CPE	<i>cytopathic effect</i>
Cy	Cyclohexyl
Cys	Cystein
CySyn	Cyclosporin-Synthetase
d	Dublett (NMR)
δ	chemische Verschiebung in ppm (NMR)

DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEP	Diethylphosphat
DET	Diethylester
DEPBT	3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-on
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
(DHQ) ₂ PHAL	1,4- <i>bis</i> -(Dihydrochininyl)-phtalazin
(DHQD) ₂ PHAL	1,4- <i>bis</i> -(DihydrochinidinyI)-phtalazin
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyl- <i>N</i> -ethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
MAPA	3-(Dimethylamino)-1-propylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenylhydrazin
DTT	Dithiotreitol
E	Enzym
<i>E</i>	„entgegen“
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESyn	Enniatin-Synthetase
<i>ee</i>	<i>enantiomeric excess</i> ; Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstoßionisation
eq	molare Äquivalente
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisation
EtOAc	Ethylacetat
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometrie
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Gln	Glutamin
h	Stunde
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat

HBTU	O-Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMW	<i>high molecular weight</i>
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> ; Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> ; hochauflösende Massenspektrometrie
HTS	High-Throughput-Screening; Hochdurchsatz Testierung
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
IC	<i>inhibitory concentration</i> ; Inhibitorkonzentration
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ile	Isoleucin
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR)
k _{cat}	Wechselzahl
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplex
k _i	Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
k _{2nd}	Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung
Konz.	Konzentration
Lac	Lactat
Leu	Leucin
LiOH	Lithiumhydroxid
LMW	<i>low molecular weight</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Lys	Lysin
m	Multiplett (NMR)
MCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MeLi	Methylolithium
MeOH	Methanol

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i> ; minimale Hemmkonzentration
MMPP	Magnesium-monoperoxyphthalat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MurA	UDP-N-Acetylglucosamin-enolpyruvyl-transferase
NCL	<i>Native Chemical Ligation</i>
Nle	Norleucin
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> ; Kernspinresonanz
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PDB	Proteindatenbank
PDC	Pyridiniumdichromat
PDE	Nucleotid-Phosphodiesterase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFSyn	PF-Synthetase
PG	<i>protecting group</i> ; Schutzgruppe
Phe	Phenylalanin
PheLac	Phenyllactat
Phg	Phenylglycin
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin
Pro	Prolin
PrOH	Propanol
ppm	<i>parts per million</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinphosphonium Hexafluorophosphat
PyBroP	Brom- <i>tris</i> -pyrrolidinphosphonium Hexafluorophosphat
Pyr	Pyroglutamyl
q	Quartett (NMR)
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
s	Singulett (NMR)

SAM	S-Adenosylmethionin
SAR	<i>structure-activity relationship</i> ; Struktur-Wirkungsbeziehung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SPPS	<i>solid phase peptid synthesis</i> ; Festphasenpeptidsynthese
t	Triplett (NMR)
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Tetrafluoroborat
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyl
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> ; Trifluoressigsäure
TFFH	Tetramethylfluoroformamidinim Hexafluorophosphat
TGEV	<i>transmissible gastroenteritis virus</i>
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TIPS	Triisopropylsilan
TMSI	Trimethylsilyliodid
TMSCI	Trimethylsilylchlorid
TMSCHN ₂	Trimethylsilyldiazomethan
TMTH	<i>trimethyltin hydroxide</i> ; Trimethylzinnhydroxid
TNF	Tumornekrosefaktor
TCL	<i>thinlayer liquid chromatography</i>
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UNAG	<i>UDP-N-Acetyl-glucosamin</i>
UPLC	<i>ultra-performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VB	<i>valence bond</i>
v _i	Anfangsgeschwindigkeit
V _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Z	„zusammen“
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Literaturverzeichnis

- [1] A. Payen, J. F. Persoz, *Ann. Chim.* **1833**, 53, 72-73.
- [2] W. Kuehne, *Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg* **1877**, 1, 190-193.
- [3] W. Kuehne, *Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg* **1877**, 1, 194-198.
- [4] A. J. Barrett, *Ciba Foundation symposium* **1979**, 75, 1-13.
- [5] C. Lopez-Otin, C. M. Overall, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3(7), 509-519.
- [6] J. S. Bond, P. E. Butler, *Ann. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 333-364.
- [7] Y. Yabuki, K. Kubota, M. Kojima, H. Inoue, K. Takahashi *FEBS Lett.* **2004**, 569, 161-164.
- [8] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes* **2004**, 1, 1047.
- [9] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes* **2004**, 1, 1047.
- [10] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes* **2004**, 2, 1089.
- [11] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, *Biochem. J.* **1993**, 290, 205-218.
- [12] A. C. Storer, R. Menard, *Methods Enzymol.* **1994**, 244, 486-500.
- [13] H. H. Otto, T. Schirmeister, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 133-171.
- [14] N. D. Rawlings, F. R. Morton, A. J. Barrett, *MEROPS* **2006**, 34, 270-272.
- [15] I. G. Kamphuis, K. H. Kalk, M. B. Swarte, J. Drenth, *J. Mol. Biol.* **1984**, 179(2), 233-256.
- [16] F. Lecaille, J. Kaleta, D. Broemme, *Chem. Rev.* **2002**, 102(12), 4459-4488.
- [17] B. Turk, D. Turk, V. Turk, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1477, 98-111.
- [19] I. Dolenc, B. Turk, G. Pungercic, A. Ritonja, V. Turk, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270(37), 21626-21631.
- [20] J. Guay, J.-P. Falgoutret, A. Ducret, M. D. Percival, J. A. Mancini, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267(20), 6311-6318.
- [21] T. Fox, E. de Miguel, J. S. Mort, A. C. Storer, *Biochemistry* **1992**, 31(50), 12571-12576.
- [22] E. Carmona, E. Dufour, C. Plouffe, S. Takebe, P. Mason, J. S. Mort, R. Ménard, *Biochemistry*, **1996**, 35(25), 8149-8157.
- [23] Y. L. Guo, U. Kurz, J. E. Schultz, C. C. Lim, B. Wiederanders, K. Schilling, *FEBS Lett.* **2000**, 469, 203-207.

- [24] C. J. Billington, P. Mason, M.-C. Magny, J. S. Mort, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 276(3), 924-929.
- [25] G. Maubach, K. Schilling, W. Rommerskirch, I. Wenz, J. E. Schultz, E. Weber, B. Wiederanders, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 250(3), 745-750.
- [26] D. Turk, G. Guncar, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2003**, 59(2), 203-213.
- [27] K. Schilling, A. Korner, S. Sehmisch, A. Kreusch, R. Kleint, Y. Benedix, A. Schlabrakowski, B. Wiederanders, *Biol. Chem.* **2001**, 382(5), 859-865.
- [28] D. Bromme, A. Schierhorn, H. Kirschke, B. Wiederanders, *Biochem. J.* **1989**, 263(3), 861-866.
- [29] Y. Yamamoto, S. Watabe, T. Kageyama, S. Y. Takahashi, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1999**, 42(3), 167-178.
- [30] R. L. Chapman, S. E. Kane, A. H. Erickson, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272(13), 8808-8816.
- [31] K. Nissler, S. Kreusch, W. Rommerskirch, W. Strubel, E. Weber, *Biol. Chem.* **1998**, 379(2), 219-224.
- [32] K. C. Pandey, S. X. Wang, P. S. Sijwali, A. L. Lau, J. H. McKerrow, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102(26), 9138-9143.
- [33] M. E. McGrath, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 181-204.
- [34] S. Pinitglang, A. B. Watts, M. Patel, J. D. Reid, M. A. Noble, S. Gul, A. Bokth, *Biochemistry* **1997**, 36(33), 9968-9982.
- [35] D. Turk, G. Guncar, M. Pdobnik, B. Turk, *J. Biol. Chem.* **1998**, 379(2), 137-147.
- [36] K. M. Karrer, S. L. Peiffer, M. E. DiTomas, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993, 90(7), 3063-3067.
- [37] T. Wex B. Levy, H. Wex, D. Broemme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 259(2), 401-407.
- [38] B. Cathers, C. Barrett, J. Palmer, R. Rydzewski, *Bioorg. Chem.* **2002**, 30, 264-275.
- [39] D. Musil, D. Zucic, D. Turk, R. A. Engh, I. Mayr, R. Huber, T. Popovic, V. Turk, T. Towatari, N. Katunuma, W. Bode, *EMBO J.* **1991**, 10(9), 2321-2330.
- [40] L. Polgar, C. Csoma, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262(30), 14448-53.
- [41] H. E. Khouri, C. Plouffe, S. Hasnain, T. Hirama, A. C. Storer, R. Ménard, *Biochem. J.* **1991**, 275(3), 751-757.
- [42] D. K. Nagler, A. C. Storer, F. C. Portaro, E. Carmona, L. Juliano, R. Menard, *Biochemistry* **1997**, 36(41), 12608-12615.
- [43] O. Quraishi, D. K. Nagler, T. Fox, J. Sivaraman, M. Cygler, J. S. Mort, A. C. Storer, *Biochemistry* **1999**, 38(16), 5017-5023.
- [44] V. Stoka, B. Turk, V. Turk, *IUBMB Life* **2005**, 57(4-5), 347-353.
- [45] D. K. Nagler, R. Menard, *FEBS Lett.* **1998**, 434(1,2), 135-139.

- [46] J. Sivaraman, D. K. Nagler, R. Zhang, R. Menard, M. Cygler, *J. Mol. Biol.* **2000**, 295(4), 939-951.
- [47] D. Turk, B. Turk, V. Turk, *Biochem. Soc. Symp.* **2003**, 70, 15-30.
- [48] A. H. Erickson, *J. Cell. Biochem.* **1989**, 40(1), 31-41.
- [49] D. K. Gupta, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **1984**, 365(8), 867-876.
- [50] Y. Nishimura, T. Kawabata, K. Kato, *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, 261(1), 64-71.
- [51] R. Matsueda, H. Umeyama, E. Kominami, N. Katunuma, *Chem. Lett.* **1988**, 11, 1857-1860.
- [52] A. J. Barrett, H. Kirschke, *Methods in Enzymol.* **1981**, 80, 535-561.
- [53] H. A. Chapman, R. J. Riese, G. Shi, *Annu. Rev. Physiol.* **1997**, 59, 63-88.
- [54] K. Honey, A. Y. Rudensky, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3(6), 472-482.
- [55] T. Nakagawa, P. Wong, A. Y. Rudensky, *Science*, **1998**, 280, 450-453.
- [56] G. P. Shi, R. Bryant, R. Riese, *J. Exp. Med.* **2000**, 191(7), 1177-1185.
- [57] W. Roth, J. Deussing, V. A. Botchkarev, M. Pauly-Evers, P. Saftig, A. Hafner, P. Schmidt, W. Schmahl, J. Scherer, I. Anton-Lamprecht, K. von Figura, R. Paus, C. Peters, *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2000**, 14(13), 2075-2086.
- [58] P. Saftig, E. Hunziker, O. Wehmeyer, S. Jones, A. Boyde, W. Rommerskirch, J. D. Moritz, P. Schu, K. von Figura, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95(23), 13453-13458.
- [59] C. J. Linnevers, M. E. McGrath, R. Armstrong, F. R. Mistry, M. G. Barnes, J. L. Klaus, J. T. Palmer, B. A. Katz, D. Broemme, *Protein Sci.* **1997**, 6(4), 919-921.
- [60] C. T. N. Pham, T. J. Ley, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96(15), 8627-8632.
- [61] P. J. Wolters, W. W. Raymond, J. L. Blount, and G. H. Caughey *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(21), 18551-18556.
- [62] H. Kirschke, I. Schmidt, B. Wiederanders, *Biochem. J.* **1986**, 240(2), 455-459.
- [63] B. Turk, I. Dolenc, V. Turk, J. G. Bieth, *Biochemistry* **1993**, 32(1), 375-380.
- [64] A. E. Eakin, A. A. Mills, G. Harth, J. H. McKerrow, C. S. Craik, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(11), 7411-7420.
- [65] M. Sajid, J. H. McKerrow, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, 120(1), 1-21.
- [66] B. E. Turk, L. C. Cantley, *Application: WO*, **2002**, 126-144.
- [67] N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, D. Turk, L. Moroder, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5(9), 1789-1797.
- [68] M. Jaaattelae, *Oncogene* **2004**, 23(16), 2746-2756.
- [69] N. Fehrenbacher, M. Gyrd-Hansen, B. Poulsen, U. Felbor, T. Kallunki, M. Boes, E. Weber, M. Leist, M. Jaaattelae *Cancer Res.* **2004**, 64(15), 5301-5310.
- [70] W. Li, X. Yuan, G. Nordgren, H. Dalen, G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, U. T. Brunk, *FEBS Lett.* **2000**, 470(1), 35-39.

- [71] T. Cirman, K. Oresic, G. D. Mazovec, V. Turk, J. C. Reed, R. M. Myers, G. S. Salvesen, B. Turk, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(5), 3578-3587.
- [72] J. J. Reiners, J. A. Caruso, P. Mathieu, B. Chelladurai, X. M. Yin, D. Kessel, *Cell Death Differ.* **2002**, 9(9), 934-944.
- [73] P. Boya, K. Andreau, D. Poncet, N. Zamzami, J.-L. Perfettini, *J. Exp. Med.* **2003**, 197(10), 1323-1334.
- [74] K. Kagedal, M. Zhao, I. Svensson, U. T. Brunk, *Biochem. J.* **2001**, 359(2), 335-343.
- [75] N. Katunuma, A. Matsui, Q.T. Le, K. Utsumi, G. Salvesen, A. Ohashi, *Adv. Enzyme Reg.* **2004**, 44, 1-10.
- [76] J. Liu, G. K. Sukhova, J.-S. Sun, W.-H. Xu, P. Libby, G.-P. Shi, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, 24(8), 1359-1366.
- [77] H. Erdal, M. Berndtsson, J. Castro, U. Brunk, M. C. Shoshan, and S. Linder, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102(1), 192-197.
- [78] M. E. Guicciardi, M. Leist, G. J. Gore, *J. Clin. Invest.* **2000**, 106(9), 1127-1137.
- [79] L. Foghsgaard, D. Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, M. Leist, M. Jäättelä, *J. Cell Biol.* **2001**, 153(5), 999-1010.
- [80] N. Liu, S. M. Raja, F. Zazzeroni, S. S. Metkar, R. Shah, M. Zhang, Y. Wang, G. Franzoso, P. G. Ashton-Rickardt, *EMBO J.* **2003**, 22(19), 5313-5322.
- [81] C. Tardy, H. Autefage, V. Garcia, T. Levade, N. Andrieu-Abadie *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(51), 52914-52923.
- [82] V. Stoka, B. Turk, S. L. Schendel, T.-H. Kim, T. Cirman, S. J. Snipas, L. M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Broemme, S. Krajewski, J. C. Reed, X.-M. Yin, V. Turk, G. S. Salvesen, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(5), 3149-3157.
- [83] B. D. Gelb, R. J. Desnick, *Science* **1996**, 273(5279), 1236-1238.
- [84] C. Toomes, J. James, A. J. Wood, C. L. Wu, D. McCormick, N. Lench, C. Hewitt, L. Moynihan, E. Roberts, C. G. Woods, A. Markham, M. Wong, R. Widmer, K. A. Ghaffar, M. Pemberton, I. R. Hussein, S. A. Temtamy, R. Davies, A. P. Read, P. Sloan, M. J. Dixon, N. S. Thakker, *Nat. Gen.* **1999**, 23(4), 421-424.
- [85] H. Kirschke, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, *Protein Profile* **1995**, 2(14), 1587-1643.
- [86] J. M. Delaisse, P. Ledent, G. Vaes, *Biochem. J.* **1991**, 279(1), 167-174.
- [87] A. Baici, A. Lang, D. Hoerler, R. Kissling, C. Merlin, *Ann. Rheum. Diseases.* **1995**, 54(4), 289-297.
- [88] A. Baici, A. Lang, D. Hoerler, R. Kissling, C. Merlin, *Ann. Rheum. Diseases.* **1995**, 54(4), 281-288.
- [89] N. Sohar, H. Hammer, I. Sohar, *Biol. Chem.* **2002**, 383(5), 865-869.
- [90] J. S. Mort, A. D. Recklies, A. R. Poole, *Arthr. Rheum.* **1984**, 27(5), 509-515.

- [91] A. M. Cataldo, P. A. Paskevich, E. Kominami, R. A. Nixon, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, 88(24), 10998-11002.
- [92] S. Yan, M. Sameni, B. F. Sloane, *Biol. Chem.* **1998**, 379(2), 113-123.
- [93] J. E. Koblinski, M. Ahram, B. F. Sloane, *Clin. Chim. Acta* **2000**, 291(2), 113-135.
- [94] B. F. Sloane, K. Moin, T. T. Lah, *Biochem. Mol. Asp. Selec. Cancers* **1994**, 2, 411-466.
- [95] M. C. Burleigh, A. J. Barrett, G. S. Lazarus, *Biochem. J.* **1974**, 137(2), 387-398.
- [96] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, 201(1), 189-198.
- [97] Q. Nguyen, J. S. Mort, P. J. Roughley, *Biochem. J.* **1990**, 266(2), 569-573.
- [98] W.-S. Hou, Z. Li, F. Buttner, E. Bartnik, D. Broemme, *Biol. Chem.* **2003**, 384(6), 891-897.
- [99] M. R. Buck, K. V. Honn, J. D. Crissman, N. C. Rao, N. C., K. V. Honn, B. F. Sloane, *Biochem. J.* **1992**, 282(1), 273-278.
- [100] H. Kobayashi, M. Schmitt, L. Goretzki, N. Chucholowski, J. Calvete, M. Kramer, W. A. Gunzler, F. Janicke, H. Graeff *J. Biol. Chem.* **1991**, 266(8), 5147-5152.
- [101] J. A. Joyce, A. Baruch, K. Chehad, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F.-Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Bogyo, D. Hanahan *Cancer Cell* **2004**, 5(5), 443-453.
- [102] S. S. Lakka, C. S. Gondi, N. Yanamandra, W. C. Olivero, D. H. Dinh, M. Gujrati, J. S. Rao, *Oncogene* **2004**, 23(27), 4681-4689.
- [103] S. D. Konduri, Konduri, S. S. Lakka, A. Tasiou, N. Yanamandra, C. S. Gondi, D. H. Dinh, W. C. Olivero, M. Gujrati, J. S. Rao, *Int. J. Oncol.* **2001**, 19(3), 519-524.
- [104] S. A. Remple, M. L. Rosenblum, T. Mikkelsen, P.-S. Yan, K. D. Ellis, W. A. Golembieski, M. Sameni, J. Rozhin, G. Ziegler, B. F. Sloane, *Cancer Res.* **1994**, 54(23), 6027-6031.
- [105] M. J. Murnane, K. Sheahan, M. Ozdemirli, S. Shuja *Cancer Res.* **1991**, 51(4), 1137-1142.
- [106] A. A. Sinha, B. J. Quast, M. J. Wilson, P. K. Reddy, D. F. Gleason, B. F. Sloane, *Anticancer Res.* **1999**, 19(4B), 2821-2829.
- [107] L. Lin, S. Aggarwal, T. W. Glover, M. B. Orringer, S. Hanash, D. G. Beer, *Cancer Res.* **2000**, 60(5), 1341-1347.
- [108] S. K. Mazmanian, G. Liu, E. R. Jensen, E. Lenoy, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 5510-5515.
- [109] P. S. Sijwali, K. Kentaro, K. B. Seydel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 8721-8726.
- [110] P. S. Sijwali, R. Bhaskar, J. Gut, P. J. Rosenthal, *Biochem. J.* **2001**, 481-489.
- [111] V. Palakodeti, A. Mohmmmed, A. Kumar, M. Hossain, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2005**, 336, 1062-1068.

- [112] S. Jaracz, J. Chen, L. V. Kuznetsova, I. Ojima, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13(17), 5043-5054.
- [113] J. T. Palmer, D. Rasnick, J. L. Klaus, *In Patent*; WO 9630353, **1996**, pp 92.
- [114] J. L. Klaus, D. Rasnick, J. T. Palmer, Y.-L. Kuo, *In Patent*; WO 9640737, **1996**, pp 79.
- [115] J. C. Powers, L. Asgian, O. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4639-4750.
- [116] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27(2), 157-162.
- [117] V. Turk, W. Bode, *FEBS Lett.* **1991**, 285, 213-219.
- [118] H. Hall, K. Hakansson, R. W. Mason, A. Grubb, M. Abrahamson, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 5115-5121.
- [119] M. A. Fernandez, Y. H. Liang, M. Abrahamson, X. D. Su, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 18221-18228.
- [120] J. P. Freije, M. Abrahamson, I. Olafsson, G. Velasco, A. Grubb, C. Lopez-Otin, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 20538-20543.
- [121] J. Ni, M. Abrahamson, M. Zhang, M. A. Fernandez, A. Grubb, J. Su, G. Y. Yu, Y. Li, D. Parmelee, L. Xing, T. A. Coleman, S. Gentz, R. Thotakura, N. Nguyen, M. Hesselberg, R. Gentz, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 10853-10858.
- [122] J. Ni, M. A. Fernandez, L. Danielsson, R. A. Chillakuru, J. Zhang, A. Grubb, J. Su, R. Gentz, M. Abrahamson, *J. Biol. Chem.* **1998**, 272, 24797-24804.
- [123] G. Sotiropoulou, A. Anisowicz, R. Sager, *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, 272, 903-910.
- [124] M. Abrahamson, A. Ritonja, M. A. Brown, A. Grubb, W. Machleidt, A. J. Barrett, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 9688-9694.
- [125] D. Kerbiriou, J. H. Griffin, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 12020-12027.
- [126] T. Aoyagi, H. Umezawa, *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation* **1975**, 2, 429-454.
- [127] S. Kondo, *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, 17(9), 1896-1901.
- [128] T. Sasaki, T. Kikuchi, N. Yumoto, N. Yoshimura, T. Murachi, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259(20), 12489-12494.
- [129] M. Saito, N. Kawaguchi, M. Hashimoto, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 51(3), 861-868.
- [130] K. Ogura, M. Maeda, M. Nagai, T. Tanaka, K. Nomoto, T. Murachi, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49(3), 799-805.
- [131] T. Moldoveanu, R. L. Campbell, D. Cuerrier, P. L. Davies, *J. Mol. Biol.* **2004**, 343(5), 1313-1326.
- [132] T. Sasaki, M. Kishi, M. Saito, T. Tanaka, N. Higuchi, E. Kominami, N. Katunuma, T. Murachi, *J. Enzyme Inhib.* **1990**, 3(3), 195-201.
- [133] R. L. Stein, F. Melandri, L. Dick, *Biochemistry* **1996**, 35(13), 3899-3908.
- [134] E. Shaw, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1990**, 63, 271-347.

- [135] X. Wang, R. Sato, M. S. Brown, X. Hua, J. L. Goldstein, *Cell* **1994**, 77(1), 53-62.
- [136] S. W. Sherwood, A. L. Kung, J. Roitelman, R. D. Simoni, R. T. Schimke, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, 90(8), 3353-3357.
- [137] S. A. Milligan, M. W. Owens, M. B. Grisham, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 335(2), 388-395.
- [138] J. O'Connor Westerik, R. J. Wolfenden, *Biol. Chem.* **1972**, 247, 8195-8197.
- [139] J. A. Mattis, J. B. Henes, J. S. Fruton, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 6776-6782.
- [140] J. M. La Londe, B. Zhao, W. W. Smith, C. A. Janson, R. L. Desjarlais, T. A. Tomaszek, S. A. Carr, S. K. Thompson, D. S. Yamashita, D. F. Veber, S. S. Abdel-Meguid, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4567-4576.
- [141] J. Drenth, K. H. Kalk, H. M. Swen, *Biochemistry* **1976**, 15(17), 3731-3738.
- [142] J. E. Olson, G. K. Lee, A. Semenov, P. J. Rosenthal, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7(4), 633-638.
- [143] Z. Jia, S. Hasnain, T. Hiram, X. Lee, J. S. Mort, R. To, C. P. Huber, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270(10), 5527-5533.
- [144] P. E. Wilcox, *Biochemistry* **1971**, 10(20), 3728-3738.
- [145] Z. Li, F. E. Cohen, *Chem. Biol.* **1994**, 1(1), 31-37.
- [146] M. M. Wasilewski, K. C. Lim, J. Phillips, J. H. McKerrow, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, 81(2), 179-189.
- [147] W. R. Roush, F. V. Gonzalez, J. H. McKerrow, E. Hansell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8(19), 2809-2812.
- [148] J. C. Engel, P. S. Doyle, J. H. McKerrow, *Medicina*, **1999**, 59(2), 171-175.
- [149] J. R. Somoza, H. Zhan, K. K. Bowman, L. Yu, K. D. Mortara, J. T. Palmer, J. M. Clark, M. E. McGrath, *Biochemistry* **2000**, 39(41), 12543-12551.
- [150] H. U. Demuth, *J. Enzyme Inhib.* **1990**, 3(4), 249-278.
- [151] L. Polgar, *Eur. J. Biochem.* **1973**, 33(1), 104-109.
- [152] K. Hanada, M. Tamai, S. Yamagishi, J. Ohmura, I. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42(3), 523-528.
- [153] K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, I. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42(3), 529-536.
- [154] K. Hanada, M. Tamai, S. Morimoto, T. Adachi, S. Ohmura, I. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42(3), 537-541.
- [155] T. Inaba, Y. Hirayama, N. Fujinaga, *Agric. Biol. Chem.* **1979**, 43(3), 655-656.
- [156] H. Sugita, S. Ishiura, K. Suzuki, K. Imahori, *J. Biochem.* **1980**, 87(1), 339-341.
- [157] T. Towatari, K. Tanaka, D. Yoshikawa, N. Katunuma, *J. Biochem.* **1978**, 84(3), 659-671.
- [158] Y. Yabe, D. Guillaume, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110(12), 4043-4044.

- [159] K. I. Varughese, F. R. Ahmed, P. R. Carey, S. Hasnain, C. P. Huber, A. C. Storer, *Biochemistry* **1989**, 28(3), 1330-1332.
- [160] K. I. Varughese, S. Ying, D. Cromwell, S. Hasnain, N. Xuong, *Biochemistry* **1992**, 31(22), 5172-5176.
- [161] A. Fujishima, Y. Imai, T. Nomura, Y. Fujisawa, Y. Yamamoto, T. Sugawara, *FEBS Lett.* **1997**, 407(1), 47-50.
- [162] M. Murata, S. Miyashita, C. Yokoo, M. Tamai, K. Hanada, K. Hatayama, T. Towatari, T. Nikawa, N. Katunuma, *FEBS Lett.* **1991**, 280(2), 307-310.
- [163] T. Towatari, T. Nikawa, M. Murata, C. Yokoo, M. Tamai, K. Hanada, N. Katunuma, *FEBS Lett.* **1991**, 280(2), 311-315.
- [164] D. Turk, M. Podobnik, T. Popovic, N. Katunuma, W. Bode, R. Huber, V. Turk, *Biochemistry*, **1995**, 34(14), 4791-4797.
- [165] D. J. Buttle, M. Murata, C. G. Knight, A. J. Barrett, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 299(2), 377-380.
- [166] N. Katunuma, E. Murata, H. Kakegawa, A. Matsui, H. Tsuzuki, H. Tsuge, D. Turk, V. Turk, M. Fukushima, Y. Tada, T. Asao, *FEBS Lett.* **1999**, 458(1), 6-10.
- [167] N. Katunuma, Y. Matsunaga, A. Matsui, H. Kakegawa, K. Endo, I. Inubushi, T. Saibara, Y. Ohba, T. Kakiuchi, *Advan. Enzyme Regul.* **1999**, 39, 247-260.
- [168] H. Tsuge, T. Nishimura, Y. Tada, T. Asao, D. Turk, V. Turk, N. Katunuma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 266(2), 411-416.
- [169] N. Katunuma, H. Tsuge, M. Nukatsuka, M. Fukushima, *Advan. Enzyme Regul.* **2002**, 42, 159-172.
- [170] C. Parkes, A. A. Kembhavi, A. J. Barrett, *Biochem. J.* **1985**, 230(2), 509-516.
- [171] J. T. Palmer, D. Rasnick, J. L. Klaus, D. Broemme, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3193-3196.
- [172] T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **1999**, 42(4), 560-572.
- [173] I. O. Donkor, *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7(12), 1171-1188.
- [174] J. Haruta *et al.*, **1991**, (Japan Tobacco, Inc., Japan), Application: WO. p. 88 pp.
- [175] M. Tamai, C. Yokoo, M. Murata, K. Oguma, K. Sota, E. Sato, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35(3), 1098-1104.
- [176] C. Giordano, R. Calabretta, C. Gallina, *Eur. J. Med. Chem.* **1993**, 28(12), 917-926.
- [177] M. Tamai, K. Matsumoto, S. Omura, I. Koyama, Y. Ozawa, K. Hanada, *J. Pharmacobio-Dynamics* **1986**, 9(8), 672-677.
- [178] N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, L. Moroder, *FEBS Lett.* **1998**, 421(1), 80-82.
- [179] T. Noda, K. Isogai, N. Katunuma, Y. Tarumoto, M. Ohzeki, *J. Biochemistry* **1981**, 90(3), 893-896.

- [180] D. Yamamoto, K. Matsumoto, H. Ohishi, T. Ishida, M. Inoue, K. Kitamura, H. Mizuno, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266(22), 14771-14777.
- [181] D. Turk, M. Podobnik, R. Kuhelj, M. Dolinar, V. Turk, *FEBS Lett.* **1996**, 384(3), 211-214.
- [182] M. Tamai, C. Yokoo, M. Murata, K. Oguma, K. Sota, E. Sato, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35(3), 1098-1104.
- [183] K. W. Wang, P.-W. Yuen, *Trends Pharm. Sci.* **1994**, 15(11), 412-419.
- [184] E. B. McGowan, E. Becker, T.C. Detwiler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 158(2), 432-435.
- [185] I. Stern, N. Schaschke, L. Moroder, D. Turk, *Biochem. J.* **2004**, 381(2), 511-517.
- [186] N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, T. Laßleben, C. P. Sommerhoff, L. Moroder, W. Machleidt, *FEBS Lett.* **2000**, 482(1,2), 91-96.
- [187] K. N. Balaji, N. Schaschke, W. Machleidt, M. Catalfamo, P.A. Henkart, *J. Exp. Med.* **2002**, 196(4), 493-503.
- [188] N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleit, T. Laßleben, C. P. Sommerhoff, L. Moroder, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10(7), 677-680.
- [189] N. Schaschke, H. J. Musiol, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, S. Rudolph-Bohner, L. Moroder, *Biol. Chem.* **2002**, 383(5), 849-852.
- [190] K. Matsumoto, H. Mizuno, K. Kitamura, W. C. Tse, C. P. Huber, T. Ishida, *Biopolymers* **1999**, 51(1), 99-107.
- [191] D. Greenbaum, K. F. Medzihradszky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2000**, 7(8), 569-581.
- [192] V. Hook, S. Yasothornsrikul, D. Greenbaum, K. F. Medzihradszky, K. Troutner, T. Toneff, R. Bunday, A. Logrinova, T. Reinheckel, C. Peters, M. Bogyo, *Biol. Chem.* **2004**, 385(6), 473-480.
- [193] A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Morre, J. Hudson, L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M. R. Grever, J. C. Byrd, D. Botstein, P. O. Brown, L. M. Staudt, *Nature* **2000**, 403(6769), 503-511.
- [194] M. Bogyo, S. Verhelst, V. Bellingard-Dubouchaud, S. Toba, D. Greenbaum, *Chem. Biol.* **2000**, 7(1), 27-38.
- [195] A. Baruch, D. Greenbaum, E. T. Esther, P. A. Nielsen, N. B. Gilula, N. M. Kumar, M. Bogyo, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(31), 28999-29006.
- [196] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradszky, M. Bogyo, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1(1), 60-68.

- [197] D. Greenbaum, W. Arnold, F. Lu, L. Hayrapetian, A. Baruch, J. Krumrine, S. Toba, K. Chehade, D. Broemme, I. Kuntz, *Chem. Biol.* **2002**, 9(10), 1085-1094.
- [198] M. Bogyo, D. Greenbaum, **2002**, Application: WO. p. 121 pp.
- [199] S. H. L. Verhelst, M. Bogyo, *ChemBioChem*, **2005**, 6(5), 824-827.
- [200] J. L. Asgian, K. E. James, Z. Z. Li, W. Carter, A. J. Barrett, J. Mikolajczyk, G. S. Salvesen, J. C. Powers, *J. Med. Chem.* **2002**, 45(23), 4958-4960.
- [201] K. E. James, M. G. Gotz, Karen, C. R. Caffery, R. Conor, E. Hansell, W. Carter, A. J. Barrett, J. H. McKerrow, J. C. Powers, *Biol. Chem.* **2003**, 384(12), 1613-1618.
- [202] K. E. James, J. L. Asgian, Z. Z. Li, O. D. Ekici, J. R. Rubin, J. Mikolajczyk, G. S. Salvesen, J. C. Powers, *J. Med. Chem.* **2004**, 47(6), 1553-1574.
- [203] D. Kato, S. H. Verhelst, K. B. Sexton, M. Bogyo, *Org. Lett.* **2005**, 7(25), 5649-5652.
- [204] J. R. Somoza, J. T. Palmer, J. D. Ho, *J. Mol. Biol.* **2002**, 322(3), 559-568.
- [205] T. Goto, T. Yamaza, T. Tanaka, *J. Electron Microsc.* **2003**, 52(6), 551-558.
- [206] D. Wang, W. Li, M. Pechar, P. Kopechova, D. Broemme, J. Kopecek, *J. Pharm.* **2004**, 277(1-2), 73-79.
- [207] D. N. Deaton, S. Kumar, *Prog. Med. Chem.* **2004**, 42, 245-375.
- [208] V. Turk, J. Kos, B. Turk, *Cancer Cell*, **2004**, 5(5), 409-410.
- [209] G. K. Sukhova, Y. Zhang, J.-H. Pan, Y. Wada, T. Yamamoto, M. Naito, T. Kodama, S. Tsimikas, J. L. Witztum, M. L. Lu, Y. Sakara, M. T. Chin, P. Libby, G.-P. Shi, *Clin. Invest.* **2003**, 111(6), 897-906.
- [210] G. Abbenante, D. P. Fairlie, *Med. Chem.* **2005**, 1(1), 71-104.
- [211] T. Bauer, J. Gajewiak, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 9163-9170.
- [212] G. Piancatelli, A. Scettri, M. D'Auria, *Synthesis*, **1982**, 245-258.
- [213] S. Baskaran, I. Islam, M. Raghavan, S. Chandrasekaran, *Chem. Lett.* **1987**, 1175-1178.
- [214] Mo Huson, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 1651-1653.
- [215] J.-J. Vanden Eyden, A. Mayence, A. Maquestiau, *Tetrahedron* **1992**, 48(3), 463-468.
- [216] T. Inokuchi, S. Matsumoto, T. Nishiyama, S. Torii, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 462-466.
- [217] M. Frigerio, M. Santagostino, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35(43), 8019-8022.
- [218] K. Omura, A. K. Sharma, D. Swern, *J. Org. Chem.* **1976**, 41(6), 957-962.
- [219] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7277-7287.
- [220] R. L. Amey, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5294-5298.
- [221] G. Wittig, G. Geissler, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 580, 44-57.
- [222] G. Wittig, U. Schöllkopf, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1954**, 87, 1318-1330.
- [223] F. Palacios, C. Alonso, D. Aparicio, G. Rubiales, J. M. De los Santos, *Tetrahedron* **2007**, 63, 523-575.
- [224] L. Horner, H. M. R. Hoffmann, H. G. Wippel, *Chem. Ber.* **1958**, 91, 61-63.

- [225] L. Horner, H. M. R. Hoffmann, H. G. Wippel, G. Klahre, *Chem. Ber.* **1959**, 92, 2499–2505.
- [226] W. S. Wadsworth, W. D. Emmons, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 1733.
- [227] W. S. Wadsworth, W. D. Emmons, *Org. Synth.* **1973**, 5, 547.
- [228] W. S. Wadsworth, *Org. React.* **1977**, 25, 73–253.
- [229] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Spektrum: München, **2004**.
- [230] S. Sano, T. Takehisa, S. Ogawa, K. Yokoyama, Y. Nagao, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50(9), 1300-1302.
- [231] C. Patois, P. Savignac, E. Abot-Jaudet, N. Collignon, *Org. Synth.* **1998**, 9, 88.
- [232] C. Patois, P. Savignac, E. Abot-Jaudet, N. Collignon, *Org. Synth.* **1996**, 73, 152.
- [233] W. C. Still, C. Gennari, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 4405-4408.
- [234] S. Sano, K. Yokoyama, M. Shiro, Y. Nagao, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50(5), 706-709.
- [235] K. Ando, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1934-1939.
- [236] E. J. Corey, *J. Org. Chem.* **1990**, 55(6), 1693-1694.
- [237] A. Pfenninger, *Synthesis* **1985**, 11, 89-116.
- [238] H. C. Kolb, M. S. Van Nieuwenhze, K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2483-2547.
- [239] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hertung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2768.
- [240] S. C. Sinha, E. Keinan, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 949.
- [241] S. C. Sinha, A. Sinha-Bagchi, E. Keinan, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7789.
- [242] G. A. Crispino, K. B. Sharpless, *Synthesis* **1993**, 777.
- [243] P. G. Andersson, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7047.
- [244] M. A. Andersson, R. Epple, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 472-475.
- [245] C. Clark, P. Hermans, O. Meth-Cohn, C. Moore, H. C. Taljaard, G. van Vuuren, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1378-1380.
- [246] O. Meth-Cohn, C. Moore, H. Taljaard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1988**, 2663-2674.
- [247] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Tetrahedron* **1992**, 48(48), 10515-10530.
- [248] H. Becker, M. A. Soler, K. B. Sharpless, *Tetrahedron* **1995**, 51(5), 1345-1376.
- [249] S. Greenberg, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 4016.
- [250] P. R. Fleming, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2869.
- [251] A. S. Rao, K. S. Bhat, P. L. Joshi, *Synthesis* **1984**, 142.
- [252] C. Copeland, R. V. Stick, *Aust. J. Chem.* **1982**, 35, 2257.
- [253] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.

- [254] H. D. Jakubke, *Peptide: Chemie und Biologie* Spektrum Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford **1996**, 110-143.
- [255] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [256] K. Jarowicki, P. Kocieński, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, *1*, 1589-1615.
- [257] K. Jarowicki, P. Kocieński, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, *1*, 2495-2527.
- [258] K. Jarowicki, P. Kocieński, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, *1*, 2109-2135.
- [259] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [260] J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1967-1970.
- [261] J. Coste, E. Frérot, J. Patrick, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437-2446.
- [262] V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1269-1272.
- [263] V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Synthesis* **1984**, *7*, 572-574.
- [264] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 442-445.
- [265] R. A. Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, Wiley: New Jersey, **2005**.
- [266] I. H. Segel, *Enzyme Kinetics*, Wiley: New Jersey, **1993**.
- [267] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333-369.
- [268] H. Bisswanger, *Enzymkinetik*, 2. Aufl., VCH, Weinheim, **1994**.
- [269] R. Kitz, I. B. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3245-3249.
- [270] W. X. Tian, C. L. Tsou, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028-1032.
- [271] GraFit 6.0, *Erithacus Software Ltd.*: London, **1994**.
- [272] M. Dixon, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
- [273] S. Weist, R. D. Süssmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 141-150.
- [274] J. Müller, S. C. Feifel, T. Schmiederer, R. Zocher, R. D. Süssmuth, *ChemBioChem* **2008**, *10*, 323-328.
- [275] S. C. Feifel, T. Schmiederer, T. Hornbogen, H. Berg, R. D. Süssmuth, R. Zocher, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1767 – 1770.
- [276] D. Katz, A. L. Demein, *Bacteriol. Rev.* **1977**, *41*, 449-461.
- [277] V. Behal, *Enzymes of Secondary Metabolism*, VCH, Weilheim, **1986**, 265-281.
- [278] H. Kleinkauf, H. van Döhren, *Antonie van Leeuwenhoek*, **1995**, *67*, 229-242.
- [279] S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*(24), 7036-7043.
- [280] F. Lipmann, *Acc. Chem. Res.* **1973**, *6*, 361-367.
- [281] R. Roskoski, H. Kleinkauf, W. Gevers, F. Lipmann, *Biochemistry* **1970**, *9*, 4846-4851.
- [282] W. Gevers, H. Kleinkauf, F. Lipmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1969**, *63*, 1335-1345.
- [283] R. Zocher, U. Keller, H. Kleinkauf, *Biochemistry* **1982**, *21*, 43-48.

- [284] R. L. Hamill, C. E. Higgins, H. E. Boaz, M. Groman, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 49, 4255-4258.
- [285] H. Peeters, R. Zocher, H. Kleinkauf, *J. Antibiot.* **1988**, 41, 352-359.
- [286] R. D. Plattner, P.E. Nelson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 3894-3896.
- [287] T. Hornbogen, M. Glinski, R. Zocher, *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, 108, 713-718.
- [288] W. Weckwerth, K. Miyamoto, K. Iinuma, M. Krause, M. Glinski, T. Strom, G. Bonse, H. Kleinkauf, R. Zocher, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275(23), 17909-17915.
- [289] M. Glinski, C. Urbanke, T. Hornbogen, R. Zocher, *Arch. Microbiol.* **2002**, 178, 267-273.
- [290] R. Zocher, J. Salnikow, H. Kleinkauf, *FEBS Lett.* **1976**, 71, 13-18.
- [291] A. Haese, M. Schubert, M. Herrmann, R. Zocher, *Mol. Microbiol.* **1993**, 7, 905.
- [292] A. Haese, R. Pieper, T. von Ostrowski, R. Zocher, *J. Mol. Biol.* **1994**, 243, 116.
- [293] A. Plattner, U. Nager, *Helv. Chim. Acta* **1948**, 31, 665-671.
- [294] A. Plattner, U. Nager, *Helv. Chim. Acta* **1948**, 31, 2192-2203.
- [295] E. Gümman, O. Jaag, *Phytopath.* **1950**, 16, 226-236.
- [296] E. Gümman, S. Naef-Roth, H. Kern, *Phytopath.* **1960**, 40, 45-48.
- [297] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, I. D. Ryabova, *J. Memb. Biol.* **1969**, 1, 402-430.
- [298] W. E. Morf, W. Simon, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 54(8), 2683-2704.
- [299] S. Lifson, C. E. Shanzer, *J. Biomol. Dyn.* **1984**, 2(3), 641-661.
- [300] D. Levy, A. Bluzat, M. Seigneuret, J.-L. Rigaud, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 50(12), 2105-2107.
- [301] M. Hermann, R. Zocher, A. Haese, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1996**, 9(4), 226-232.
- [302] H. Tomoda, X.-H. Huang, J. Cao, H. Nishida, R. Nagao, S. Okunda, H. Tanaka, S. Omura, *J. Antibiot.* **1992**, 1626-1632.
- [303] S. Nakajyo, K. Shimizu, A. Kometani, A. Suzuki, H. Ozaki, N. Urakawa, *Jpn. Pharmacol.* **1983**, 33, 573-582.
- [304] O. Bergendorff, H. Anke, K. Dekermenjian, M. Nielsen, S. Rudong, O. Stern, R. Witt, *J. Antibiot.* **1994**, 47(12), 1560-1561.
- [305] F. Sarabia, S. Chammaa, A. S. Ruiz, L. M. Ortiz, F. J. Herrera, *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 1309-1332.
- [306] K. A. Mereish, R. Solow, D. L. Bunner, A. B. Fajer, *Pept. Res.* **1990**, 3(5), 233-237.
- [307] E. Gümman, S. Roth, L. Ettlinger, P. A. Plattner, U. Nager, *Experientia* **1947**, 3, 202-203.
- [308] J. F. Grove, M. Pople, *Mycopathologia* **1980**, 70, 103-105.
- [309] N. Simon-Lavoine, M. Forgeot, Deutsches Patent 2851629, **1979**.
- [310] H. Tomoda, H. Nishida, X.-H. Huang, R. Masuma, Y. K. Kim, S. Omura, *J. Antibiot.* **1992**, 45(8), 1207-1215.

- [311] B. Sujudi, A. Chatim, A. Sanusi, *Asian. J. Med.* **1973**, 9, 354-355.
- [312] T. Sasaki, M. Takagi, T. Yaguchi, S. Miyadoh, T. Okada, M. Koyama, *J. Antibiot.* **1992**, 45, 692-697.
- [313] M. Takagi, T. Okada, N. Akai, T. Yaguchi, S. Miyadoh, T. Shomura, T. Sasaki, M. Sezaki, T. Shimizu, M. Niida, *European Patent Application*, **1990**, EP0382 173 A2.
- [314] G. A. Conder, S. S. Johnson, D. S. Nowakowski, T. E. Blake, F. E. Dutton, S. J. Nelson, E. M. Thomas, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 820-823.
- [315] M. Kanaoka, A. Isogai, S. Murakoshi, M. Ichinoe, A. Suzuki, S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 629-635.
- [316] L. C. Vining, W. A. Taber, *Can. J. Chem.* **1957**, 35, 1109-1116.
- [317] H. Tanzil, U. Santoso, T. David, A. Rahim, *Asian J. Med.* **1974**, 10, 13-16.
- [318] M. Ohyama, K. Iinuma, A. Isogai, A. Suzuki, *Biosic. Biotech. Biochem.* **1994**, 58, 1193-1194.
- [319] F. Dutton, S. Nelson, *J. Antibiot.* **1994**, 47, 1322-1327.
- [320] J. Scherkenbeck, A. Plant, A. Hardner, N. Mencke, *Tetrahedron* **1995**, 51, 8459-8470.
- [321] M. Terada, A. Ishih, A. Tungtrangchitr, M. Sano, T. Shomura, *Jpn. J. Parasitol.* **1993**, 42, 199-210.
- [322] M. Terada, *Jpn. J. Parasitol.* **1992**, 41, 108-117.
- [323] U. Pleiss, A. Harder, A. Turberg, M. Londershausen, K. Iinuma, N. Mencke, P. Jeschke, G. Bonse, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1996**, 38, 61-69.
- [324] U. Pleiss, A. A. Turberg, A. Harder, M. Londershausen, P. Jeschke, G. Bohem, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1996**, 38, 651-659.
- [325] C. Nilanota, M. Isaka, R. Chanphen, N. Thong-orn, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *Tetrahedron* **2003**, 59, 1015-1020.
- [326] R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, 265-289.
- [327] N. Madry, R. Zocher, K. Grodzki, H. Kleinkauf, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1984**, 20, 83.
- [328] M. Krause, A. Lindemann, M. Glinski, T. Hornbogen, G. Bonse, P. Jeschke, G. Thielking, W. Gau, H. Kleinkauf, R. Zocher, *J. Antibiot.* **2001**, 54, 797-804.
- [329] A. Lawen, R. Traber, *J. Biol. Chem.* **1993**, 26, 20452-20465.
- [330] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, V. T. Ivanov, *Tetrahedron Lett.* **1963**, 14, 885-890.
- [331] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. V. Evstratov, I. I. Mikhaleva, I. D. Ryabova, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 10, 2320-2334.
- [332] P. Brewster, F. Hiron, D. Hughes, C. Ingold, P. Rao, *Nature* **1950**, 166, 178-180.
- [333] M. Winitz, L. Bloch-Frankenthal, N. Izumiya, S. Birnbaum, C. Baker, J. Greenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 2423-2430.

- [334] F. Degerbeck, B. Fransson, L. Grehn, U. Ragnarrson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1993**, 1, 11-14.
- [335] A. Mehta, R. Jaouhari, T. J. Benson, K. T. Douglas, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33(37), 5441-5444.
- [336] I. Fleming, J. Frackenphol, H. Ila, *J. Chem. Soc., PerkinTrans.* **1998**, 1, 1229-1232.
- [337] H. Assafa, I. O. Donkor, *Abstracts of Papers*, 221st ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, April 1-5, **2001**, 2001: p. MEDI-074.
- [338] P. Tompa, P. Buzder-Lantos, A. Tantos, A. Farkas, A. Sizilagyi, Z. Banoczi, F. Hudecz, P. Friedrich, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(20), 20775-20785.
- [339] R. Menard, E. Carmona, C. Plouffe, D. Broemme, Y. Konishi, J. Lefebvre, A. C. Storer, *FEBS Lett.* **1993**, 328(1-2), 107-110.
- [340] F. C. V. Portaro, A. B. Santos, M. H. Cezari, M. A. Juliano, L. Juliano, E. Carmona, *Biochem. J.* **2000**, 347(1), 123-129.
- [341] S. S. Cotrin, L. Puzer, W. Alves de Souza, L. Juliano, A. K. Carmona, M. A. Juliano, *Anal. Biochem.* **2004**, 335(2), 244-252.
- [342] T. Bratkovic, M. Lunder, T. Popovic, S. Kreft, B. Turk, B. Strkelj, U. Urleb, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 332(3), 897-903.
- [343] P. M. St. Hilaire, M. Willert, M. A. Juliano, L. Juliano, M. Medal, *J. Comb. Chem.* **1999**, 1(6), 509-523.
- [344] D. Cuerrier, T. Moldoveanu, P. L. Davies, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280(49), 40632-40641.
- [345] T. Sasaki, T. Kikuchi, I. Fukui, T. Murachi, *J. Biochem.* **1986**, 99(1), 173-179.
- [346] H. J. Kaergel, R. Dettmer, G. Etzold, H. Kirschke, P. Bohley, J. Lagner, *FEBS Lett.* **1980**, 114(2), 257-260.
- [347] T. Hirao, K. Takahashi, *J. Biochem.* **1984**, 96(3), 775-784.
- [348] K. Takahashi, *Proteolysis* **1990**, 55-74.
- [349] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, University Press: Oxford, **2000**.
- [350] F. Sarabia, A. Sanchez-Ruiz, S. Chammaa, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 1691-1705.
- [351] A. K. Sharma, D. Swern, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 1503-1507.
- [352] C. Hartmann, V. Meyer, *Chem. Ber.* **1893**, 26, 1727-1736.
- [353] J. J. Vanden Eynde, A. Mayence, A. Maquestiau, *Tetrahedron* **1992**, 48(3), 463-468.
- [354] S. Baskaran, S. Chandrasekaran, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31(19), 2775-2778.
- [355] T. Inokuchi, S. Matsumoto, T. Nishiyama, S. Torii, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 462-466.
- [356] B. E. Maryanoff, B. A. Reitz, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 863-927.
- [357] S. Sano, Y. Takemoto, Y. Nagao, *Arkivoc* **2003**, 8, 93-101.

- [358] S. Sano, K. Yokoyama, M. Fukushima, T. Yagi, Y. Nagao, *Chem. Commun.* **1997**, 559-560.
- [359] W. S. Price, S. Fletcher, M. R. Jorgensen, A. D. Miller, *Synlett* **2006**, 12, 1933-1937.
- [360] C. Ghiglieri-Bertez, C. Coquelet, A. Alazet, C. Bonne, *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, 22, 147-152.
- [361] S. D. Broady, J. E. Rexhausen, E. J. Thomas, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, 1, 1083-1094.
- [362] D. E. Gibbs, C. Larsen, *Synthesis* **1983**, 410-413.
- [363] S. Sano, T. Ando, K. Yokoyama, Y. Nagao, *Synlett* **1998**, 777-779.
- [364] J. F. Reichwein, B. L. Pagenkopf, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1821-1824.
- [365] R. Vicik, *Promotionsschrift*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2004**.
- [366] D. L. MacPeck, P. S. Starcher, B. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 680-683.
- [367] W. D. Emmons, A. S. Pagano, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 89-93.
- [368] A. Waldemar, C. R. Saha-Möller, C.-G. Zhao, *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc. **2002**, Vol. 61, 219-267.
- [369] T. Flessner, S. Doye, *J. Prakt. Chem.* **1999**, 341(5), 436-444.
- [370] S. Rozen, M. Kol, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5155-5159.
- [371] G. B. Payne, P. H. Williams, *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 54-55.
- [372] K. S. Kirshenbaum, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1985**, 50(11), 1979-1982.
- [373] J. G. Hill, B. E. Rossiter, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3607-3608.
- [374] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 512-519.
- [375] H. Rojas-Cabrera, M. Fernandez-Zertuche, O. Garcia-Barradas, O. Munoz-Muniz, M. Ordonez, *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, 18, 142-148.
- [376] I. Ohashi, K. Harada, *Bull. Chem. Soc.* **1967**, 40, 2977-2988.
- [377] M. Tamai, C. Yokoo, M. Murata, K. Oguma, K. Sota, E. Sato, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35(3), 1098-1104.
- [378] *Organikum*, 20. Aufl., J. A. Barth Verlag, Leipzig/Heidelberg **1999**.
- [379] A. J. Barrett, *Biochem. J.* **1980**, 187, 909-912.
- [380] R. Leung-Toung, W. Li, T. F. Tam, K. Karimian, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 979-1002.
- [381] M. Mladenovic, K. Ansorg, R. F. Fink, W. Thiel, T. Schirmeister, B. Engels, *J. Phys. Chem. B.* **2008**, 112, 11798-11808.
- [382] H. Jenness, P. Hamill, R. E. W. Hancock, *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, 19, 491-511.
- [383] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.
- [384] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 535-546.
- [385] J. Boukouvalas, S. Cote, B. Ndzi, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 105-107.
- [386] F. Yang, X. Cui, Y. Li, J. Zhang, G. Ren, Y. Wu, *Tetrahedron* **2007**, 63, 1963-1969.
- [387] R. Chinchilla, C. Najera, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 874-922.

- [388] B. Saeger, H.-P. Schmitt-Wrede, M. Dehnhardt, W. P. Bente, J. Krücken, A. Harder, G. von Samson-Himmelstjerna, H. Wiegand, F. Wunderlich, *FASEB J.* **2001**, *15*, 1332-1339.
- [389] A. Harder, G. Samson-Himmelstjerna, *Parasitol. Res.* **2002**, *88*, 481-488.
- [390] F. Odier, A. Vey, J. P. Bureau, *Biol. Cell* **1992**, *74*, 267-271.
- [391] T. Hornbogen, R. Zocher, *A Handbook of Industrial Mycology*, 22, New York **2005**, 469-478.
- [392] L. G. Hammock, B. D. Hammock, J. E. Casida, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1974**, *12*(6), 759-764.
- [393] J. G. Hill, B. E. Rossiter, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3607-3608.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

R. Aaronson, M. Anthony, I. Autenrieth, K. Albert, T. O. Baldwin, R. Bares, K.-U. Bartz-Schmidt, E. O. Bayer, S. Blechert, H. D. Becker, M. Berens, P. N. Blin, K. W. Bock, K. Botzenhart, P. Bohley, K.-H. Bichler, N. Birbaumer, H. Bisswanger, S. L. Brown, G. Buchkremer, B. Bültmann, C. D. Claussen, R. S. Cohen, T. C. Daniel, J. Dichgans, K. Dietz, H. von Döhren, U. Drews, R. Dringen, K. Eisele, W. B. Frommer, H. J. Gaertner, H.-V. Gärtner, J. Giehl, M. Gregor, E. H. Grote, C. Gleiter, G. Göz, W. Grimes, R. W. Gülch, B. Hamprecht, G. Häflinger, H.-U. Häring, V. Hoffmann, G. Jahn, H. R. Kandolf, Kalbacher, L. Kanz, E. Kaiserling, U. Keller, J. Knobloch, P. Kremsner, F. Lang, H. Liebich, G. Lischka, M. Maassen, M. E. Maier, M. McEvoy, D. Mecke, W. B. Miller, H. Nienemann, D. Niethammer, A. Nordheim, H. Oberhammer, H. Oßwald, H. Pommer, H. Probst, U. Quast, J. D. Rainier, H.-G. Rammensee, G. Rassner, O. Rieß, W. Schmahl, H. Schott, H. Schwarz, M. Schwarz, U. Seidler, L. Seipel, M. Sessler, S. Sell, H.-K. Selbmann, J. Strähle, R. Süßmuth, K. Unertl, W. Voelter, K. Voigt, H.-J. Wagner, D. Wallwiener, U. Weber, U. Wehner, K. Weise, M. Weitz, U. Weser, D. Wheeler, U. Wiesing, H. Wiesinger, H. Wilhelm, K.-P. Zeller, H. P. Zenner, C. Ziegler, G. Ziemer, R. Zocher.

